

# in vitroおよびin vivoでの歯垢の酸産生に関する研究

|        |   |
|--------|---|
| 著者     | 尹 梅   |
| 学位授与機関 | Tohoku University   |
| URL    | <a href="http://hdl.handle.net/10097/54018">http://hdl.handle.net/10097/54018</a> |

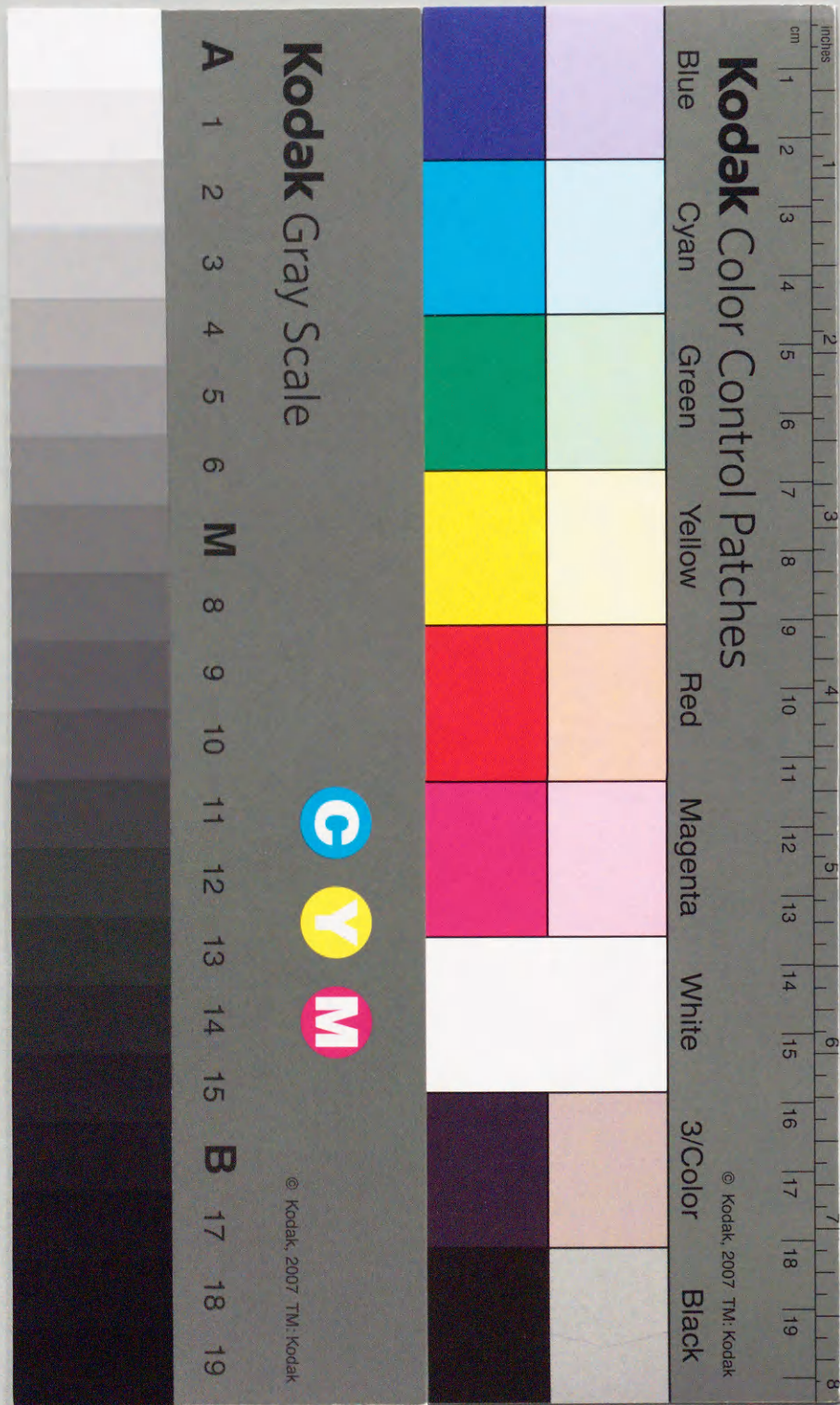


# 博士論文

in vitro および in vivoでの歯垢  
の酸産生性に関する研究

尹 梅

平成8年度提出  
東北大学





## 目 次

|  |    |
|--|----|
| 第一章 緒論   | 1  |
| 1. 1 研究の目的   | 1  |
| 1. 2 研究の背景とこれまでの経緯   | 2  |
| 参考文献   | 4  |
| 第二章 <i>in vitro</i> での酸産生の測定法の開発   | 7  |
| 2. 1 アガロース包埋歯垢を用いたpH測定装置   | 7  |
| 2. 1. 1 方法   | 7  |
| 2. 1. 2 結果および考察  | 8  |
| 2. 2 歯垢懸濁液法による酸産生の測定   | 11 |
| 2. 2. 1 方法   | 11 |
| 2. 2. 2 結果および考察  | 12 |
| 2. 3 第二章の全体的考察   | 12 |
| 参考文献   | 14 |
| 図・表  | 16 |
| 第三章 <i>in vitro</i> 歯垢懸濁液法および <i>in vivo</i> 電極内蔵法<br>による歯垢における液状試料の酸産性の評価 | 29 |
| 3. 1 方法  | 29 |
| 3. 2 結果  | 31 |
| 3. 3 考察  | 32 |
| 参考文献   | 33 |
| 図・表  | 35 |
| 第四章 日本で市販されている小児用シロップ液状総合感<br>冒剤の歯垢内酸産生性                                   | 42 |
| 4. 1 方法  | 42 |
| 4. 2 結果  | 44 |



|               |     |
|---------------|-----|
| 4. 3 考察 ..... | 4 5 |
| 参考文献 .....    | 4 7 |
| 図・表 .....     | 5 0 |
| 第五章 総括 .....  | 5 6 |

## 第一章 緒論

### 1. 1 研究の目的

齲蝕の発生・進行には種々の因子が複雑に絡み合っている。Keyesは細菌（歯垢）、糖質（発酵性糖）、宿主（歯、唾液）の三つの因子が重なり合ったときにはじめて齲蝕が発生するという、いわゆる齲蝕発生に関する“3つの輪”を提唱した<sup>1)</sup>。

歯垢は、水スプレーで洗い流すことのできないような、歯面に形成された粘着性の稠密な細菌性構造物である<sup>2)</sup>。これまで数十年にわたり、歯垢の形成<sup>3, 4)</sup>および歯垢微生物による代謝<sup>5, 6)</sup>について様々な研究がなされてきた。歯垢中には種々の細菌が生息し、複雑な生態系を営んでいる。歯垢1g（湿重量）中には、細菌が $10^{11} \sim 10^{12}$ 存在し、その種類は少なくとも50種類以上ある<sup>7)</sup>。

ところで齲蝕は、このように高密度な状態で生息している歯垢細菌が飲食物中の糖を分解して生じる有機酸によりエナメル質が脱灰されて発生する。そこで、歯垢微生物の酸産生性に関して多くの研究が行われてきた<sup>8, 9, 10)</sup>。個々の歯垢細菌の糖代謝について、多くの研究がなされてきた<sup>11, 12, 13)</sup>が、それらは特定の細菌の懸濁状態における代謝についての研究であった。しかし、歯垢中で多くの種類の細菌が、高密度にしかも複雑な生態系を形成しているため、個々の細菌での*in vitro*の研究は必ずしも実際の歯垢における糖代謝の状況を反映しているとは限らない。また、実際の歯垢は細菌が密集して生息しているため、齲蝕の発生するエナメル質表層に接する歯垢深部に到達する糖の量もきわめて制限され、歯垢表層とは異なっている。さらに、歯垢深部はきわめて嫌氣的であることが知られており<sup>14)</sup>、*in vitro*の試験管内実験の環境条件とは大きく異なっている。そこで、本研究においては対象を個々の細菌とするのではなくヒト歯垢そのものを用いて、口腔内の要因をある程度考慮した*in vitro*測定装置を作成することを試みた。また、微量歯垢を用いて酸産生を測定することのできる歯垢懸濁液法を開発した。さらに東北大学工学部で開発された超小型pH電極であるイオン感應性電界効果トランジスタ電極を用いて、歯垢のpH



を測定することにより研究をすすめた。

## 1. 2 研究の背景とこれまでの経緯

W.D. Miller (1890年) は、多くの口腔微生物が糖を発酵し、酸を生成することができるという性質をもっており、産生されるおもな酸の一つは乳酸であることを立証した。また、抜去歯を唾液と糖またはパンの混合物とともにインキュベートすると脱灰がおこることを示し、齲蝕の化学細菌説(酸脱灰説)を提唱した<sup>15)</sup>。

歯垢における酸産生性の測定に関する研究が数多く行われ、1940年 Stephan は、グルコース溶液による洗口後の歯垢 pH の経時的な変化をアンチモン電極で測定し、それが一定のパターンをとることを報告した。いわゆる Stephan 曲線といわれるものである<sup>16)</sup>。これは、発酵性の糖を含む食品の齲蝕誘発性の機序解明に大きな手がかりを提供した。

歯垢 pH の測定法についての研究では、測定器具の改良進歩とともにその測定法も変化してきている。タッチ電極法としては Stephan の報告以後、Stephan と Miller<sup>17, 18)</sup>、Stephan<sup>19)</sup>、Stralfors<sup>20)</sup>、Jenkins<sup>21)</sup>、Stain<sup>22)</sup> らなどによって報告されており、いずれもアンチモン電極が用いられている。このタッチ電極法は、口腔内で歯垢 pH の変化を直接測定する方法の1つで、歯面に形成された歯垢の中に電極をさしこんで測定する方法である。この方法では、歯垢の構造を破壊すること、さらに、電極として使用されたアンチモン自体に微生物発育抑制の作用がみられるという欠点がある。また、食品を摂取させた後、種々の部位から採取した少量の歯垢の pH を口腔外の pH メーターで測定するサンプリング法<sup>23, 24, 25)</sup>がある。サンプリング法は複雑な装置も必要とせず簡便でよい方法であるが、エナメル質に接しない、表層部の歯垢を主に測っていることなどより、電極内蔵法で測定した場合よりもほぼ 1.0 高い pH が実測されている<sup>26)</sup>。電極内蔵法には、歯垢の構造を破壊することなく歯垢中の pH を連続的に測定できるという優れた利点がある。Garf と Muhlemann<sup>27)</sup>、Imfeld<sup>28)</sup>、Miller<sup>29)</sup>、Harper ら<sup>30)</sup> はこの電極内蔵法にガラス電極を用いている。ガラス電極では、高い内部抵抗のためノイズを拾いやすく、技術的な困難が

多いこと、また、Rugg-Gunn ら<sup>31)</sup>、山田ら<sup>32)</sup> は、ガラス電極を長く口腔に入れておくと、その感応部のガラスに歯垢中の蛋白質が附着し、電極の特性の劣化、応答速度の遅延を起こすことなどを指摘している。これに対して、従来のガラス電極やアンチモン電極と異なる新しい型の小さなイオン感受性電界効果トランジスタ電極が東北大学工学部で開発された<sup>33)</sup>。Igarashi ら<sup>9)</sup>、山田ら<sup>32, 34)</sup> はこのイオン感受性電界効果トランジスタ電極を口腔内での歯垢下 pH の測定に応用するため、電極の pH 応答性、応答速度、そして口腔内細菌の増殖に対する影響を調べるとともに、この電極を用いて「歯垢下 pH 測定装置」を作製した。イオン感受性電界効果トランジスタ電極は pH 変化に対して 5 秒以内に応答した。また、細菌の増殖に対する抑制効果はみられず、さらに、咬合面や隣接面歯垢下 pH 測定装置の製作も可能である。

*in vitro* での歯垢 pH の測定の研究については、Bibby および Dawes の報告がある。1980年、Bibby ら<sup>35)</sup> は、*in vitro* での酸産生測定の装置を作製している。この装置には、ヒトの歯垢、ヒトの唾液を用いている。また、多種類の試料が同時に測定できるなどの利点があるが、この装置には、大量の歯垢が必要となる欠点もある。1984年、Lagerlof ら<sup>36)</sup> および Dawes ら<sup>37)</sup> は、人工口腔装置を作製している。彼らは、人工歯垢としてのレンサ球菌体、人工唾液を用いている。この装置で、特に唾液によるスクロースのクリアランス効果、歯垢の pH 低下などについて、多くの研究が行われた<sup>38, 39)</sup>。

本研究ではイオン感応性電界効果トランジスタ電極 pHBOY を用い、少量のヒトの歯垢を利用し、操作が簡単な *in vitro* での酸産生測定法(アガロース包埋歯垢法)を開発した。そして、この *in vitro* での酸産生測定法の応用性について検討を行い、フッ素やクロルヘキシジングルコネートによる糖代謝の阻害効果を観察した。また、開発した *in vitro* での酸産生測定法(歯垢懸濁液法)および *in vivo* 電極内蔵法を用い、液体試料の酸産生性について、比較検定を行った。さらに日本で市販されているシロップ感冒剤の酸産生性について検討した。



参考文献

- 1 ) Keyes, P. H.: Present and future measures for dental caries control. J. Am. Dent. Assoc. 79: 1395-1404, 1969.
- 2 ) Dawes, C.: The nature of dental plaque, films, and calcareous deposits. Ann. N Y. Acad. Sci. 153: 102-119, 1968.
- 3 ) Gibbons, R. J. and Van Houte, J.: On the formation of dental plaques. J. Periodontol. 44: 347-360, 1973.
- 4 ) Van Houte, J. and Leach, S. A.: Dental plaque and surface interactions in the oral cavity. Information Retrieval Limited, London, 1980, pp. 69-100.
- 5 ) Yamada, T.: Regulation of glycolysis in streptococci. Reizer, J. and Peterkofsky, K. (edit.): Sugar transport and metabolism in gram-positive bacteria. Ellis Horwood Limited, England, 1987, pp. 69-93.
- 6 ) Abbe, K., Carlsson, J., Takahashi-Abbe, S. and Yamada, T.: Oxygen and the sugar metabolism in oral streptococci. Proc. Finn. Dent. Soc. 87: 477-487, 1991.
- 7 ) Bowden, G. H. W., Ellwood, D. C. and Hamilton, I. R.: Microbial ecology of the oral cavity. Adv. Microbial Ecol. 3: 135-215, 1979.
- 8 ) Imfeld, T. N.: Identification of low caries risk dietary components. Karger Press, Basel, 1983, pp. 142-158.
- 9 ) Igarashi, K., Kamiyama, K. and Yamada, T.: Measurement of pH in human dental plaque *in vivo* with an ion-sensitive transistor electrode. Arch. oral Biol. 26: 203-207, 1981.
- 10 ) 高橋信博 : 電極内蔵法 (In-dwelling electrode method) を用いた歯垢の糖代謝活性の測定. 東北大学歯学雑誌 6: 91-98, 1987.
- 11 ) Yamada, T. and Carlsson, J.: Regulation of lactate dehydrogenase and change of fermentation products in streptococci. J. Bacteriol. 124: 55-61, 1975.
- 12 ) Iwami, Y.: Influence of environment on glycolysis in streptococci. The Kitasato Arch. Experiment. Med. 61: 1-20, 1988.
- 13 ) Takahashi, N., Kalfas, S. and Yamada, T.: Effect of acetate on sorbitol fermentation by oral lactobacilli. Oral Microbiol. Immunol. 10: 349-354, 1995.
- 14 ) Kenney, E. B.: Oxidation reduction potential of developing plaque, periodontal pockets and gingival sulci. J. Periodontol. 40: 630-633, 1969.
- 15 ) Miller, W. D.: General bacteriological studies, with special reference to the bacteria of the human mouth. In: The microorganisms of the human mouth. Miller, W. D. (1853-1907). S. Karger (edit.): Munchen, 1973, pp. 102-144.
- 16 ) Stephan, R. M.: Changes in hydrogen-ion concentration on tooth surfaces and in carious lesions. J. Am. Dent. Assoc. 27: 718-723, 1940.
- 17 ) Stephan, R. M. and Miller, B. F.: A quantitative method for evaluation physical and chemical agents which modify production of acids in bacterial plaques on human teeth. J. Dent. Res. 22: 45-51, 1943.
- 18 ) Stephan, R. M. and Miller, B. F.: The effect of synthetic detergents on pH changes in dental plaques. J. Dent. Res. 22: 53-61, 1943.
- 19 ) Stephan, R. M.: The effect of urea in counteracting the influence of carbohydrates on the pH of dental plaques. J. Dent. Res. 22: 63-67, 1943.
- 20 ) Stralfors, A.: Studies of the microbiology of caries II. The acid fermentation in the dental plaques *in situ* compared with lactobacillus count. J. Dent. Res. 27: 576-586, 1948.
- 21 ) Jenkins, G. N. and Kleinberg, I.: Studies of the pH of plaque in interproximal areas after eating sweets and starchy foods. J. Dent. Res. 35: 964, 1956.
- 22 ) Satin, E., Apton, R. and Goldman, R.: Plaque pH: an new frontier for the dental hygienist. Dent. Hyg. 52: 119-122, 1978.
- 23 ) Forstell, G.: A method for evaluation of acid potentialities of foods. Acta Odont. Scand. 28: 599-608.
- 24 ) Edgar, W. M., Hefferren, J. J. and Koehler, H. M.: Foods, nutrition and dental health. Vol. I. : Pathotox Publishers, Chicaga, 1981, pp. 137-147.
- 25 ) Jensen, M. E., Polansky, P. J. and Schachtele, C. F.: Plaque sampling and telemetry for monitoring acid production on human buccal tooth surfaces. Arch. Oral Biol. 27: 21-31, 1982.
- 26 ) Lingstrom, P., Imfeld, T. and Birkhed, D.: Comparison of three methods for measurement of plaque-pH in humans after consumption of soft bread and potato chips. J. Dent. Res. 72: 865-870.
- 27 ) Graf, H. and Muhlemann, H. R.: Telemetry of plaque pH from interdental areas. Helv. Odontol. Acta. 10: 94-101, 1966.



- 28 ) Imfeld, T. N.: Evaluation of the cariogenicity of confectionery by intra-oral wire-telemetry. Schweiz Mschr Zahnheilk. 87: 437-464, 1977.
- 29 ) Miller, H. E., McLaughlin, R. S. and Mullen, J. D.: Foods, Nutrition and dental health. American Dental Association, Chicago, 1984, pp. 165-178.
- 30 ) Harper, D. S., Gray, R. G., Lenke, J. W. and Hefferren, J. J.: Measurement of human plaque acidity: Comparison of interdental touch and indwelling electrodes. Caries Res. 19: 536-546, 1985.
- 31 ) Rugg-Gunn, A. J., Edgar, W. M. and Jenkins, G. N.: The effect of eating some British snacks upon the pH of human dental plaque. Brit. Dent. J. 145: 95-100, 1978.
- 32 ) Yamada, T., Igarashi, K. and Kamiyama, K.: Advantages and disadvantages of using an ion-sensitive transistor electrode for measuring pH in human dental plaque in vivo. Frank, R. M. and Leach, S. A. (edit.): Surface and colloid phenomena in the oral cavity: Methodological Aspects. IRL Press Ltd, London, 1981, pp. 157-166.
- 33 ) Esashi, M. and Matsuo, T.: Integrated micro multi ion sensor using field effect of semiconductor. IEEE. Trans. biomed. Engng 25: 184-192, 1978.
- 34 ) Yamada, T., Igarashi, K. and Mitsutomi, M.: Evaluation of cariogenicity of glycosylsucrose by a new method to measure pH under human dental plaque *in situ*. J. Dent. Res. 59: 2157-2152, 1980.
- 35 ) Bibby, B. G. and Huang, C. T.: Some observations on *in vitro* dental plaques. J. Dent. Res. 59: 1946-1952, 1980.
- 36 ) Lagerlof, F., Dawes, R. and Dawes, C.: Salivary clearance of sugar and its effects on pH changes by *Streptococcus mitior* in an artificial mouth. J. Dent. Res. 63: 1266-1270, 1984.
- 37 ) Dawes, C., Watanabe, S., Biglow-Lecomte, P. and Dibdin, G. H.: Estimation of the velocity of the salivary film at some different locations in the mouth. J. Dent. Res. 68: 1479-1482, 1989.
- 38 ) Dawes, C.: An analysis of factors influencing diffusion from dental plaque into a moving film of saliva and the implications for caries. J. Dent. Res. 68: 1483-1488, 1989.
- 39 ) Macpherson, L. M. D. and Dawes, C.: Effects of salivary film velocity on pH changes in an artificial plaque containing *Streptococcus oralis*, after exposure to sucrose. J. Dent.

Res. 70: 1230-1234, 1991.



## 第二章 *in vitro*での酸産生の測定法の開発

本章では、*in vitro*での二つの酸産生測定法の開発について検討を行った。一つはアガロース包埋歯垢を用いたpHの測定法であり、もう一つは歯垢懸濁液法である。前者の方法は、lagerlofら<sup>1)</sup>およびDawesら<sup>2)</sup>の人工口腔装置を参考に、ヒト口腔内における条件すなわち、唾液の洗浄作用、歯垢への浸透作用などの要件を考慮して、少量の歯垢を用い、水素イオン感応性トランジスタ電極pHBOYを用いて、ヒト歯垢のpHを測定するものである。また、この方法により歯垢のpHを測定し、フッ素などの薬剤が糖代謝にどのような影響を及ぼすかについて検討した。一方、後者の方法は、少量の歯垢で同時に多種類の試料の酸産生性が簡単に測定できるという利点をそなえた微量試料のpH測定系である。

### 2. 1 アガロース包埋歯垢を用いたpH測定装置

#### 2. 1. 1 実験の準備および方法

##### (1) 測定装置の製作(図1)と調整

###### 1) 装置、器具

イオン感応性電界効果トランジスタ電極ISFET-pHBOY-P2(改良型、図2)、恒温槽、マイクロピペット、小型ホモジナイザー、ペリスタポンプ、シリコンチューブ(内径:1mm)、活栓(三方コック)、ホットプレート、ミクロ遠心チューブ(容量1ml)、アスピレーター

###### 2) 溶液

- a. 溶解液: 0.5mM リン酸緩衝液入り150mM KCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>溶液
- b. 5%スクロース溶液: スクロースを上記の溶解液で溶かした。
- c. 1%アガロース溶液: 実験当日、アガロース0.5gを50mlの溶解液と混合し、ホットプレートで加熱しながら溶解した。
- d. 人工唾液: 実験当日、20mM KCl、10mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.3mM CaCl<sub>2</sub>、0.03mM MgCl<sub>2</sub>の混合液を使用直前に1M NaOHで中和した。この溶液中の空気をアス

ピレーターで脱気した。

### 3) 装置の調整

#### a. 歯垢の採取

被験者(女性、33歳)に実験日の前夜は歯磨きをしないように指示した。実験当日の朝食前に歯垢を採取し、洗浄液(150mM KCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM リン酸緩衝液)入り遠心チューブ(氷水中に保存)に歯垢を集めた。集めた歯垢はホモジナイザーによる均一化と、遠心処理(12,000 r.p.m.で3分間)を3回繰り返して洗浄し、唾液成分を除去した。洗浄、遠心後、歯垢の湿重量を測定した。沈澱した歯垢は使用直前まで0℃で保存した。そして、45℃の条件下で歯垢1mgを1%アガロース8μlの割合ですばやく混合し、フィンピペットを用いて、15μlを取り、39℃に温めておいたpHBOY-P2のセンサー部分にのせて、アガロース包埋歯垢を作製した。

#### b. pH測定装置の調整

アガロース包埋歯垢が固形化してから、pHBOYをポンプやチューブと接続した。人工唾液および糖溶液の流速は0.75ml/minに設定した。

### (2) アガロース包埋歯垢のpHの測定

30℃で人工唾液を流し、アガロース包埋歯垢のpHが十分に安定してから、糖溶液を添加してそのpH値を1分ごとに記録した。酸産生測定後人工唾液を流すことにより、pHを回復させた。この過程を四回繰り返した。

### 2. 1. 2 結果および考察

#### (1) 基礎的な研究について

##### 1) ヒト唾液と人工唾液の緩衝能の比較

30℃で人工唾液とヒト唾液の緩衝能を比べたところ、人工唾液の緩衝能は安静時唾液の緩衝能よりも高く、刺激唾液の緩衝能よりは低かった(図3)。

##### 2) 歯垢の量によるアガロース包埋歯垢のpHの低下



菌垢 (mg) とアガロース ( $\mu$ l) との混合比を変えてアガロース包埋菌垢を作製し、5%スクロースを加えたときの菌垢のpH低下を調べたところ、アガロースに対する菌垢の混合比が高いほどpH低下が著しかった。(図4)。アガロースに対する菌垢の割合をさらに高め、菌垢1mgに対してアガロースを7 $\mu$ l以下にすると、菌垢がアガロースに十分包埋されず、溶液を流すことによりアガロース包埋菌垢から菌垢成分が流失した。これらのことから、菌垢とアガロースの混合比は菌垢1mg対アガロース8 $\mu$ lの方が菌垢のpH低下がよく、菌垢のアガロースへの包埋程度も十分であることがわかった。そこで、以下の実験ではこの混合比を用いた。

### 3) アガロース包埋菌垢の厚さの菌垢pHへの影響

アガロース包埋菌垢 15 $\mu$ l、20 $\mu$ l、30 $\mu$ l、40 $\mu$ lをそれぞれセンサー部分に固形化させ、異なる厚さ(それぞれ0.3mm, 0.4mm, 0.7mm, 1.0mm)のアガロース包埋菌垢を作成し、菌垢pHへの影響を検討した。5%スクロースを与えたときの菌垢pHの変化を検討したところ、15 $\mu$ lあるいは20 $\mu$ lのアガロース包埋菌垢を用いた場合には、菌垢の最低pHはともに4.7であった(図5)。30 $\mu$ lあるいは40 $\mu$ lを用いた場合、菌垢の最低pHは4.9あるいは5.1であった。アガロース包埋菌垢の厚さが薄い方がpHの低下がおこりやすいこと、さらに15 $\mu$ lの方が20 $\mu$ lよりも電極センサー部分に平らに固形化されやすいことがわかった。そこで、以下の実験では15 $\mu$ lのアガロース包埋菌垢を用いた。

### 4) 糖溶液を変えたときの菌垢pHの低下

スクロース濃度を変えてアガロース包埋菌垢に与えたときの菌垢pHを比較した。糖濃度が増加するにつれて最低pHは低くなった(図6)。しかし、糖濃度が1.0%以上では、最低pHはほぼ一定であることがわかった。

### 5) 種々の糖溶液を与えたときの菌垢pHの変化

種々の糖の5%溶液をアガロース包埋菌垢に与えたときの菌垢のpH低下を比較検討した(図7)。スクロースやフラクトースでは菌垢のpH低下が大きく、ソルビトールではほとんど酸産生がみられなかった。ラクト

ースでの酸産生性はこれらのほぼ中間に位置していた。

### 6) アガロース包埋菌垢で得られたpH低下カーブの再現性

同一アガロース包埋菌垢に5%スクロースを流した場合のpH低下カーブの再現性を検討した。得られたpH低下カーブは4回目までは再現性があった(図8)。このことから、この実験条件では、4回目までは菌垢の活性がほぼ安定であると考えられた。しかし、5回目の測定から菌垢pHの低下が小さくなる傾向が見られた。すなわち、菌垢を繰り返し使用することにより菌垢の活性が失なわれていくことがわかった。

## (2) アガロース包埋菌垢を用いた酸産生実験

### 1) フッ素を加えたときの糖代謝に対する影響

フッ素を添加した後の菌垢の糖代謝について検討した。フッ素を含まない5%グルコースでは、菌垢の最低pHが4.9であったが、グルコースに1mMフッ化ナトリウムを加えたときの菌垢の最低pHは5.7までしか低下しなかった(図9)。フッ素を添加したグルコースを代謝させた後、人工唾液で十分洗滌し、再びグルコースを代謝させるとその時の最低pHは5.2となり、対照でグルコースを代謝させた時よりも最低pHが高くなった。このことから、フッ素は、グルコースや産生された酸と異なり、人工唾液では洗い流されにくく、おそらくは、アガロース包埋菌垢に吸着しているものと推定された。そして、フッ素によって、ATPaseやエノラゼによる触媒される糖代謝が阻害され、酸産生性を減少する<sup>3, 4)</sup>と考えられた。この実験により、フッ素によるグルコースの代謝に対する阻害効果にはある程度持続性があると推察された。ただし、持続性に関して結論づけるためにはさらに詳細な検討が必要になると考えられる。

### 2) ラウリン酸塩を添加したときの糖代謝の影響

0.5mM ラウリン酸ナトリウムを5%グルコースに添加した場合の菌垢pHを検討したところ、ラウリン酸ナトリウムを添加しないグルコースでは、菌垢の最低pHは4.9であった(図10)。それに対して、ラウリン酸ナトリウムを加えた場合には、菌垢の最低pHは5.7であり、グルコースだけの時よりも最低pHが0.8も高かった。人工唾液で十分洗滌した



後グルコースを再び与えた場合、対照グルコースと比べると歯垢のpH低下は小さかった。ラウリン酸塩にはレンサ球菌の糖代謝を阻害する効果のあることが報告されている<sup>5)</sup>。本研究より、ラウリン酸塩による糖代謝にはある程度持続性があると推察された。ただし、持続性に関して結論づけるためにはさらに詳細な検討が必要になるものと考えられた。

### 3) クロルヘキシジングルコネートによる歯垢の糖代謝の影響

5%グルコースに0.1%クロルヘキシジングルコネートを加えたときの歯垢の最低pHは4.8であり、対照グルコースでの歯垢の最低pH4.6よりも0.2高かった。人工唾液で薬剤などを十分洗滌した後グルコースを代謝させた場合の歯垢の最低pHが対照の最低pHよりも0.4高かった(図11)。このことから、クロルヘキシジングルコネートは歯垢の糖代謝を阻害し、さらにこの阻害効果は持続性があると考えられた。クロルヘキシジングルコネートは口腔の細菌などに急速に吸着され、また、細胞膜の正常機能を妨害することによって細胞の透過性を変化させて、歯垢の細菌糖代謝を破壊して酸産生を阻害すると報告されている<sup>6~9)</sup>。

## 2. 2 歯垢懸濁液法による酸産生の測定

### 2. 2. 1 方法

#### (1) 歯垢の採取および歯垢懸濁液の調整

被験者(女性、33歳)に実験日の前夜は歯磨きをしないように指示した。実験当日の朝食前に歯垢を採取し、歯垢懸濁用溶液(150mM KCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM リン酸緩衝液)入りプラスチック遠心チューブ(氷水中に保存)に歯垢を集めた。集めた歯垢はホモジナイザーによる均一化と、遠心処理(12,000 r.p.m.で3分間)を2回繰り返して洗浄し、唾液成分を除去した。洗浄、遠心後、歯垢の湿重量を測定した。歯垢湿重量1mgに対して、1.5μlの歯垢懸濁用溶液を加えホモジナイザーにより均一化した試料を歯垢懸濁液とした。歯垢懸濁液は使用直前まで0℃で保存した。

#### (2) 歯垢懸濁液を用いた歯垢pH変化の測定

35℃の恒温器内で、pHBOYのセンサー部に歯垢懸濁液8μlを滴下し、

糖溶液12μlを加え攪拌したのち、そのpH値を1分間隔で30分間記録した。

### 2. 2. 2 結果および考察

#### (1) 糖の濃度を変えたときの歯垢pHの低下

スクロースの濃度を変えて歯垢懸濁液に添加したときの歯垢pHの低下を比較検討した。糖濃度が高くなるにつれて最低pHは低くなった(図12)。0.1%の糖溶液では、糖添加5分間以内で酸産生が鈍ってしまうが、これは歯垢内細菌によって糖が短時間のうちにごく低濃度になるまで消費されたためと考えられた。しかし、歯垢の最低pHは5%の糖濃度以上で、ほぼ飽和に達した。

#### (2) 各種の糖を与えたときの歯垢pHの変化

種々の糖の10%溶液を歯垢懸濁液に加えたときの歯垢のpH低下を比較検討した。スクロースやフラクトースでは歯垢のpH低下が大きく、ソルビトールでは、歯垢のpHがまったく低下しなかった(図13)。すなわち、ソルビトールによる酸産生性が見られなかった。そして、ラクトースでは、酸産生性はこれらのほぼ中間に位置していた。

### 2. 3 第二章の全体的考察

#### 1. アガロース包埋歯垢を用いたヒト歯垢のpH測定装置について

微小試料のpH測定が可能なpHメーターのセンサー上に、アガロースと混合して微量の歯垢を包埋させたアガロース包埋歯垢を作成し、塊状の歯垢の糖代謝を測定した。本装置は作成が容易で、操作も簡単で、経済的であるという利点がある。本装置を用いて実際の口腔内に近い状態、すなわち塊状の歯垢のpH変化を観察することを試みた。この方法では、歯垢細菌を塊状にして糖代謝を行わせることができるので、一つの実験を行った後でも糖や酸を洗い流すことにより、同じ歯垢を何度も繰り返し使用することが可能である。アガロース包埋歯垢を3、4回繰り返し用いてもスクロースによる酸産生性はほとんど変わらなかった。そこで、この実験シ



システムは糖代謝などに持続的な影響を与える物質などを対象として実験する場合には大きな役割を果たすと考えられた。実際、フッ素やクロルヘキシジンなどを用いた実験では、それらの薬剤効果の持続性を検討することができた。

しかし、この方法では、味覚などによる唾液分泌の効果の影響などを検討することができないこと、キャンデーやガム、クッキーなど固形の被検試料を検討できないことなどの欠点がある。また、被検試料自体に多少とも緩衝能がある場合などには、その緩衝能による影響がpH測定の結果に大きく影響するという問題もある。緩衝能に関する問題はさらに実験システムを詳細に検討し、改良を加えることによりある程度改善できると思われるが、今回は十分な検討を行うことはできなかった。

## 2. 菌垢懸濁液法について

代用糖などの酸産生性の検討は従来*Streptococcus mutans*などの特定の細菌を用いて行われてきた。しかし、それらの単一の細菌を用いる場合には、細菌を培養する条件により、酸産生の程度に大きな差異が生ずることが知られている。すなわち、ソルビトールで培養した*S. mutans*はソルビトールを分解するが、グルコースで培養した*S. mutans*はソルビトールを代謝しないのである<sup>10)</sup>。そこで、*in vitro*の実験においてもヒト菌垢を用いて検討することは大きな意義をもつものと考えられる。

しかし、ヒトから採取できる菌垢の量には限界があり、懸濁状態で実験を行う場合でも多種類の被検試料を扱うことには困難があった。そこで、今回は微量試料のpH測定が可能なpHメーターを用いることにより、わずか20 $\mu$ lの菌垢懸濁液でも測定可能な実験システムを開発した。その結果、この実験システムを応用した場合には、一度に多種類の液状試料の酸産生性を簡便な操作で、かつ短時間に測定することが可能となった。しかし、この方法でも被検試料にわずかでも緩衝能がある場合には、pHの測定結果に大きな差異が生ずるなど欠点のあることがわかった。それらについては、第三章以降に、*in vivo*電極内蔵法により得られる結果と十分に比較検討を行い、考察する。

## 参考文献

- 1) Lagerlof, F., Dawes, R. and Dawes, C.: Salivary clearance of sugar and its effects on pH changes by *Streptococcus mitior* in an artificial mouth. J. Dent. Res. 63: 1266-1270, 1984.
- 2) Dawes, C., Watababe, S., Biglow-Lecomte, P. and Dibdin, G. H.: Estimation of the velocity of the salivary film at some different locations in the mouth. J. Dent. Res. 68: 1479-1482.
- 3) Hata, S., Iwami, Y., Kamiyama, K. and Yamada, T.: Biochemical mechanisms of enhanced inhibition of fluoride on the anaerobic sugar metabolism by *Streptococcus sanguis*. J. Dent. Res. 69: 1244-1247.
- 4) Ekstrand, J.: Fluoride in Dentistry. Munksgaard, Copenhagen, 1996, pp. 230-232.
- 5) Iwami, Y., Schachtele, C. F. and Yamada, T.: Effect of sucrose monolaurate on acid production. levels of glycolytic intermediates and enzyme activities of *Streptococcus mutans* NCTC 10449. J. Dent. Res. 74: 1613-1617, 1995.
- 6) Iwami, Y., Schachtele, C. F. and Yamada, T.: Mechanism of inhibition of glycolysis in *Streptococcus mutans* NCIB 11723 by chlorhexidine. Oral. Microbiol. Immunol. 10: 360-364, 1995.
- 7) Loe, H. and Schiott, C. R.: The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man. J. Periodontal Res. 5: 79-83, 1970.
- 8) Oppermann, R. V.: Effect of chlorhexidine on acidogenicity of dental plaque *in vivo*. Scand. J. Dent. Res. 87: 302-308, 1979.
- 9) Maltz-Turkienicz, M., Krasse, B. and Emilson, C. G.: Effects of chlorhexidine and iodine on *in vitro* plaques of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis*. Scand. J. Dent. Res. 88: 28-33, 1980.
- 10) Yamada, T., Takahashi-Abbe, S. and Abbe, K.: Effects of oxygen on pyruvate formate-lyase *in situ* and sugar metabolism of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis*. Infect. Immun. 47: 129-134, 1985.



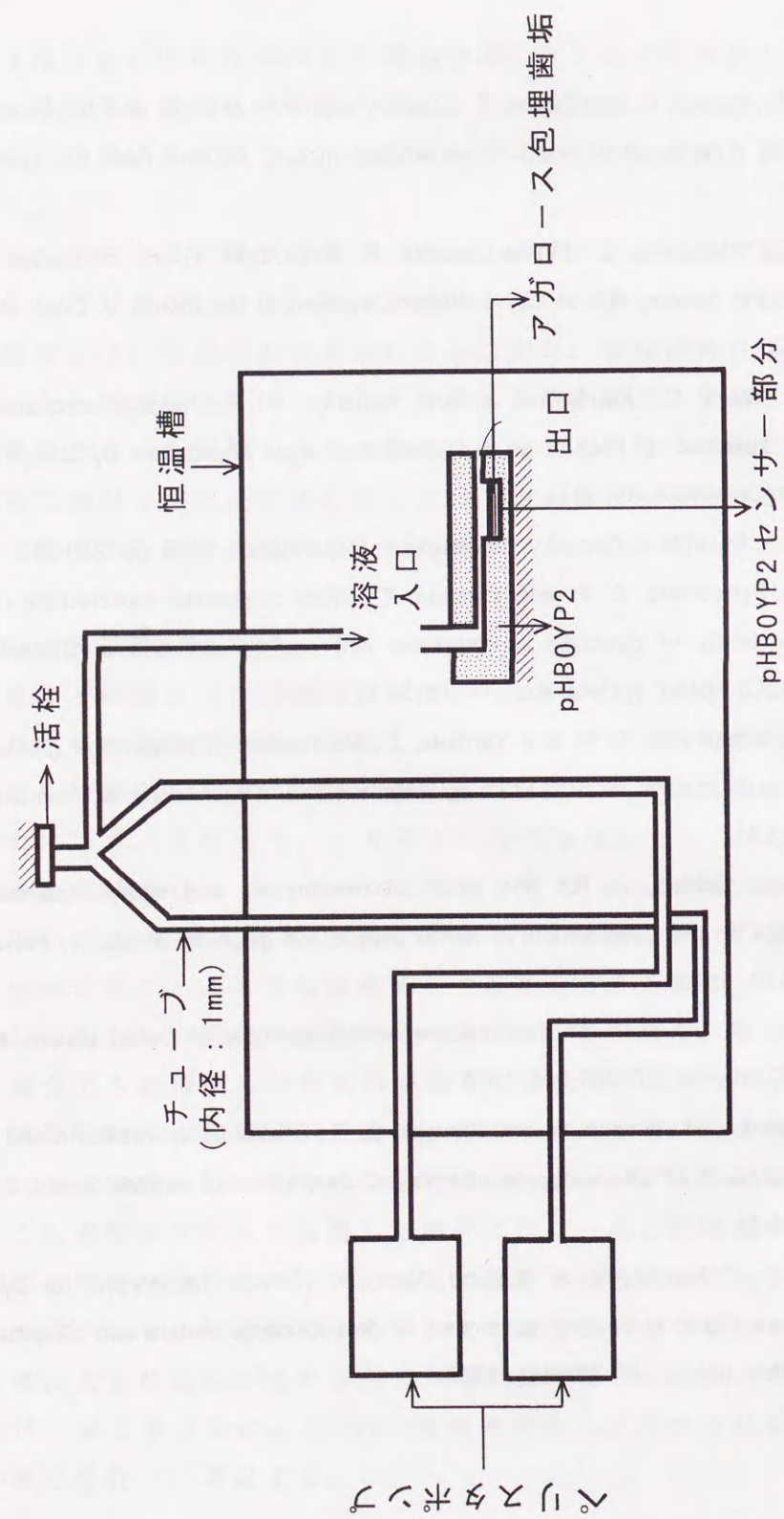


図1 アガロース包埋電極を用いたpH測定装置



図2 水素イオン感応性電界効果トランジスタ電極



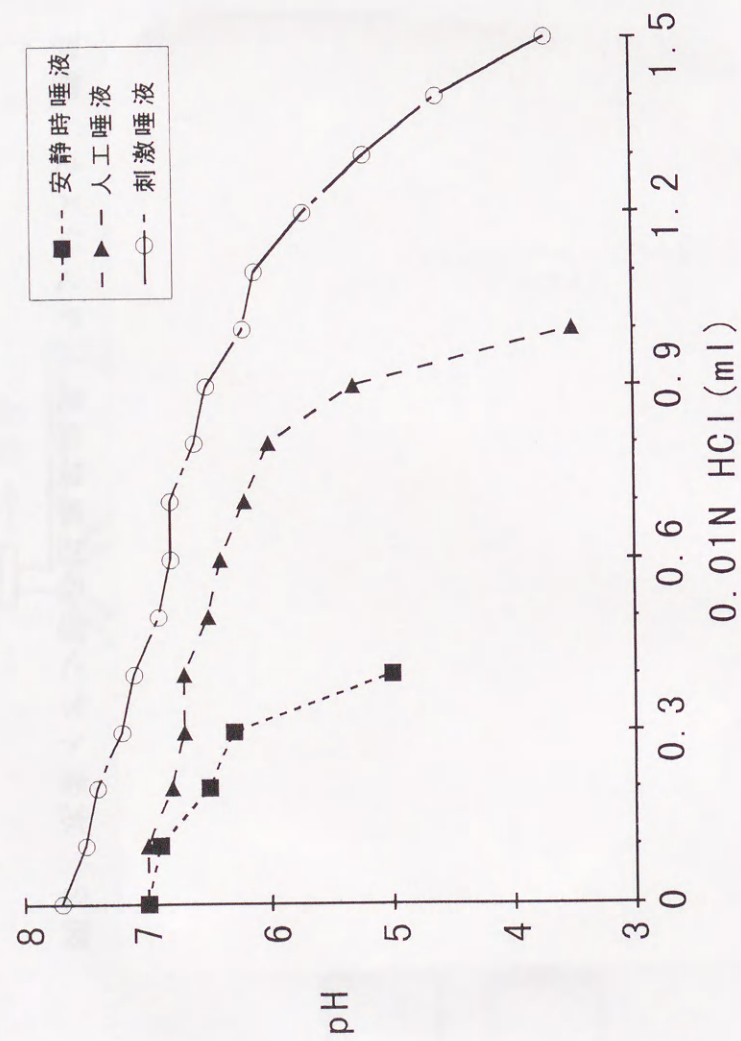


図3 ヒト唾液と人工唾液の緩衝能の比較

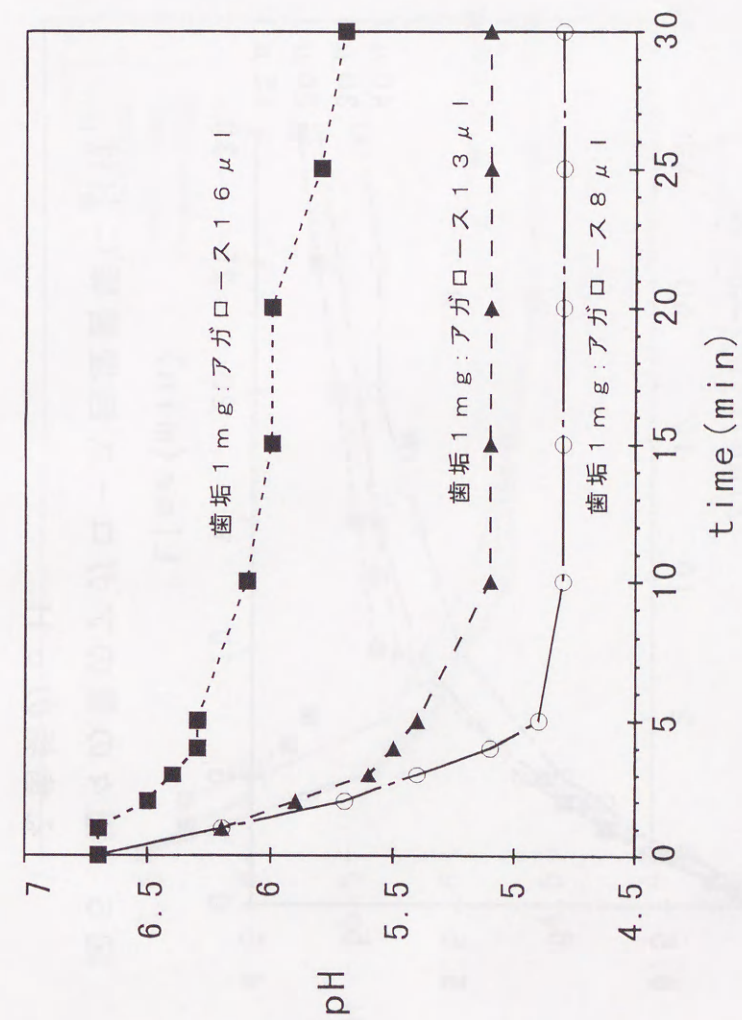


図4 菌垢に対するアガロースの混合量を変化させた時の菌垢のpH



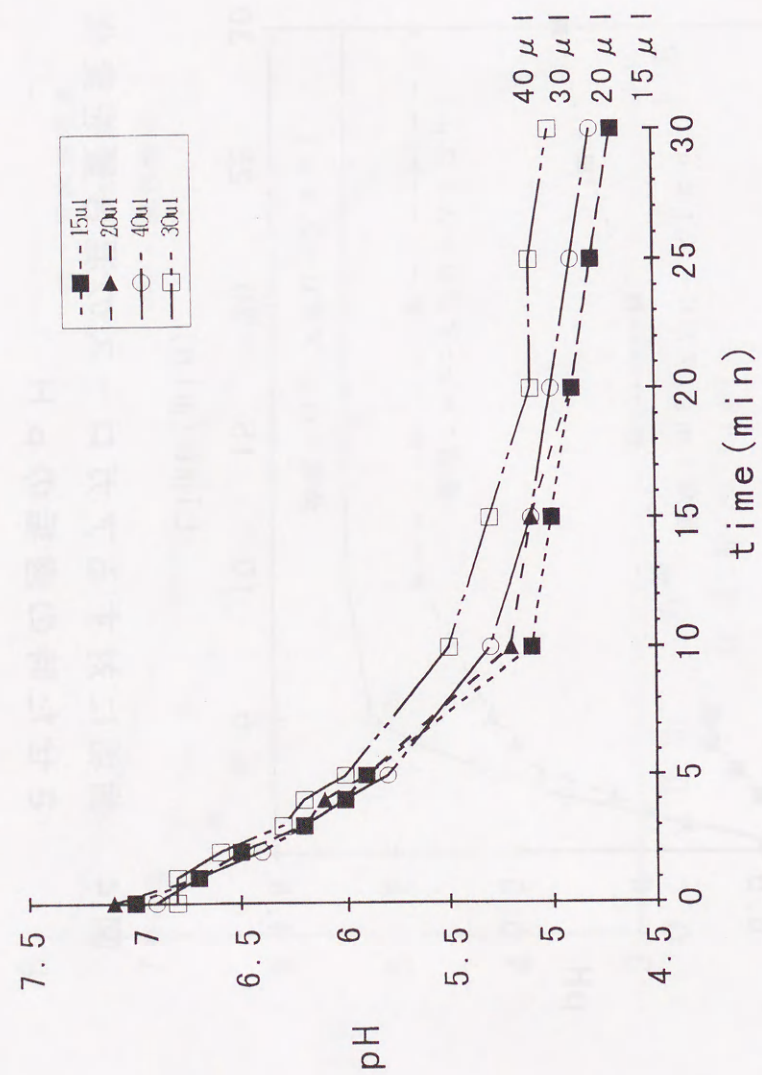


図5 種々の量のアガロース包埋菌垢における菌垢のpH

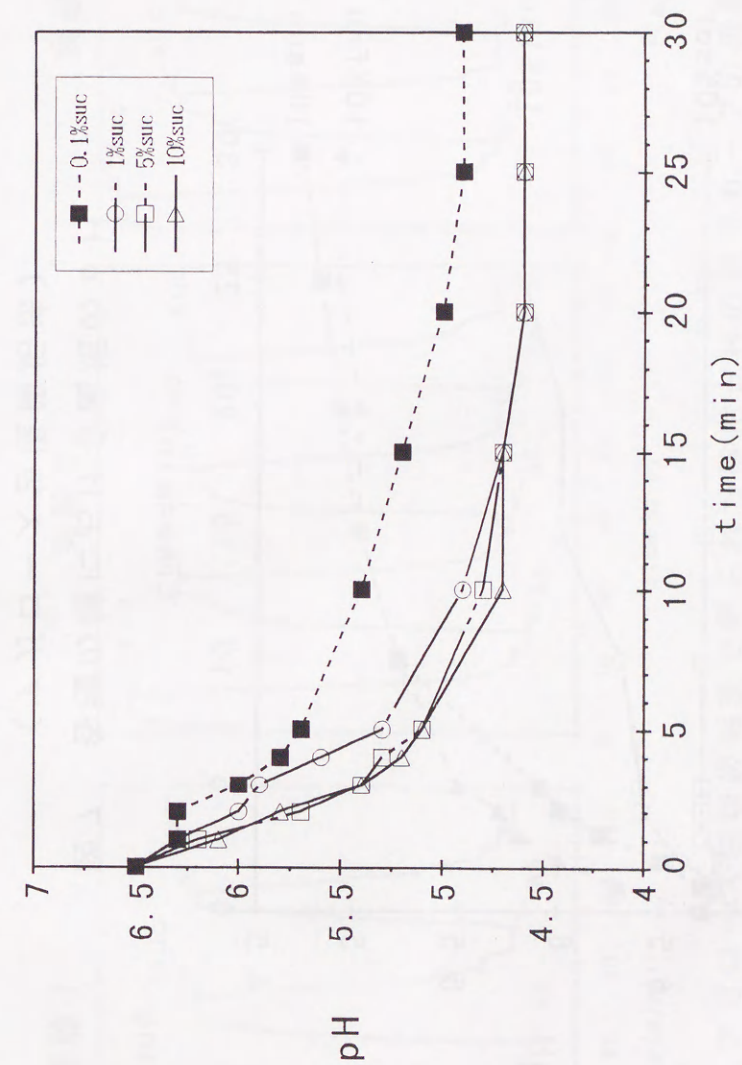


図6 種々の濃度のスクロースにおける菌垢のpH  
(アガロース包埋菌垢法)



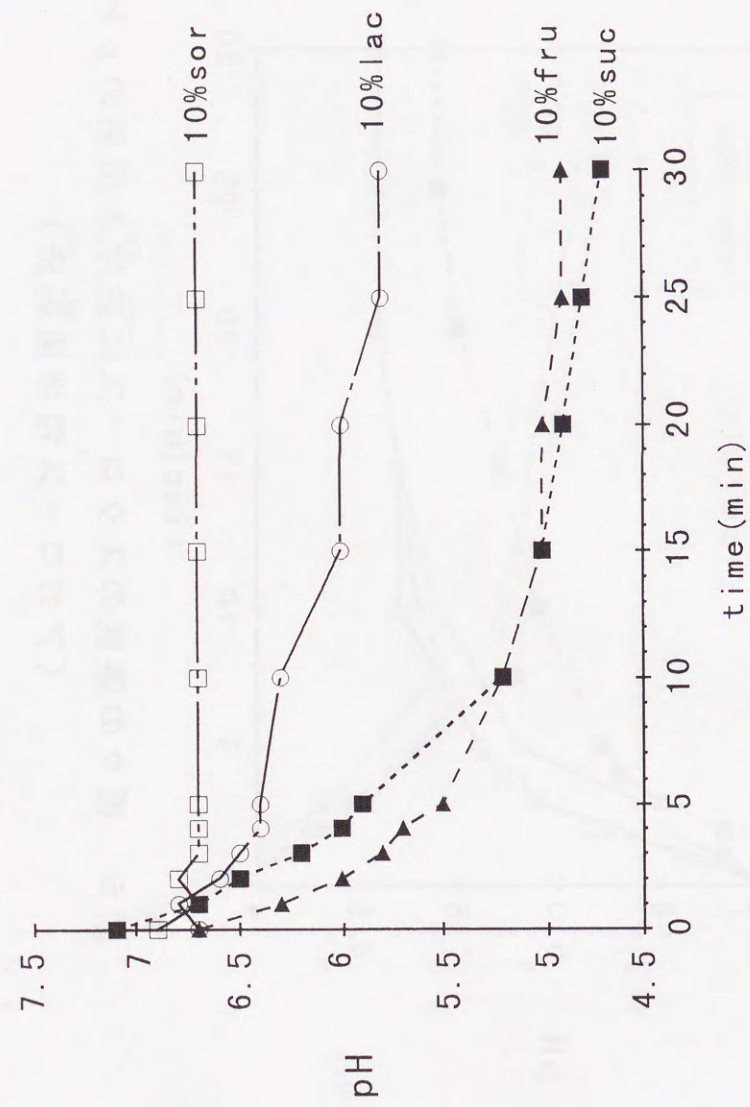


図7 各種の糖における菌垢のpH  
(アガロース包埋菌垢法)

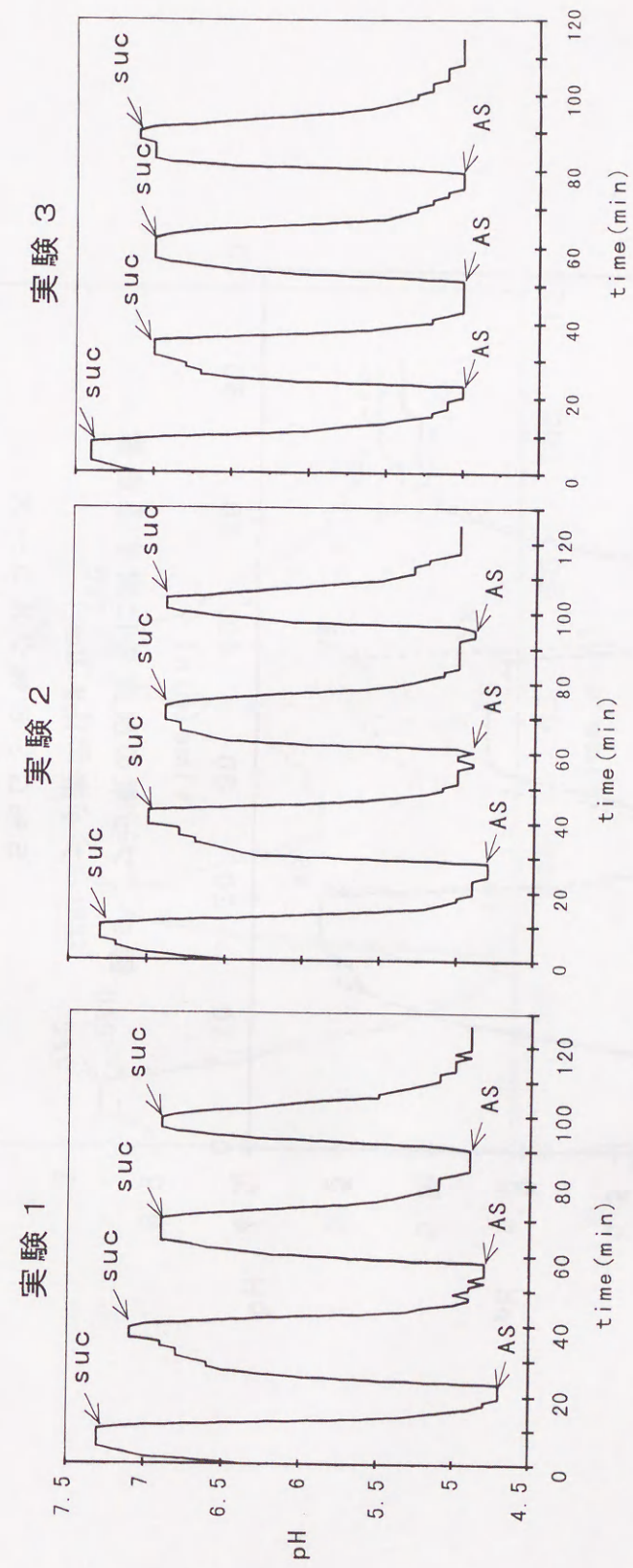


図8 アガロース包埋菌垢法で得られた菌垢pHの低下カーブの再現性  
SUC: 5%スクロース  
AS: 人工唾液



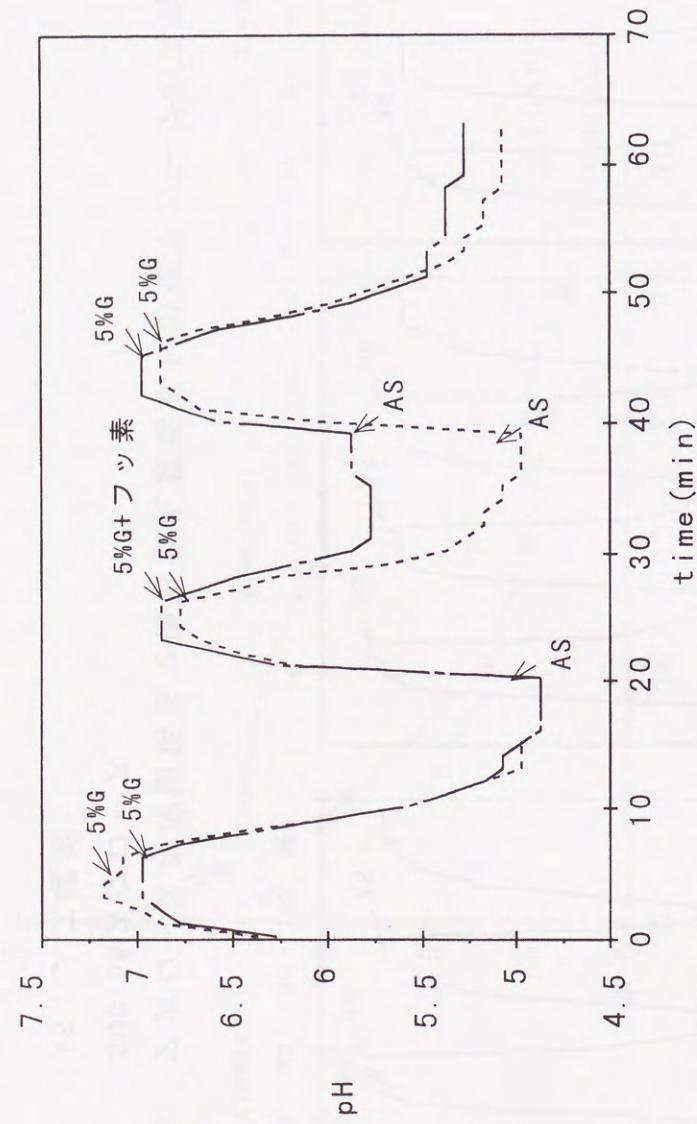


図9 フッ素の酸産生に対する影響

フッ素 : 1mM NaF

5 % G : 5 % グルコース

----- フッ素を含まない5 % グルコースによる対照実験

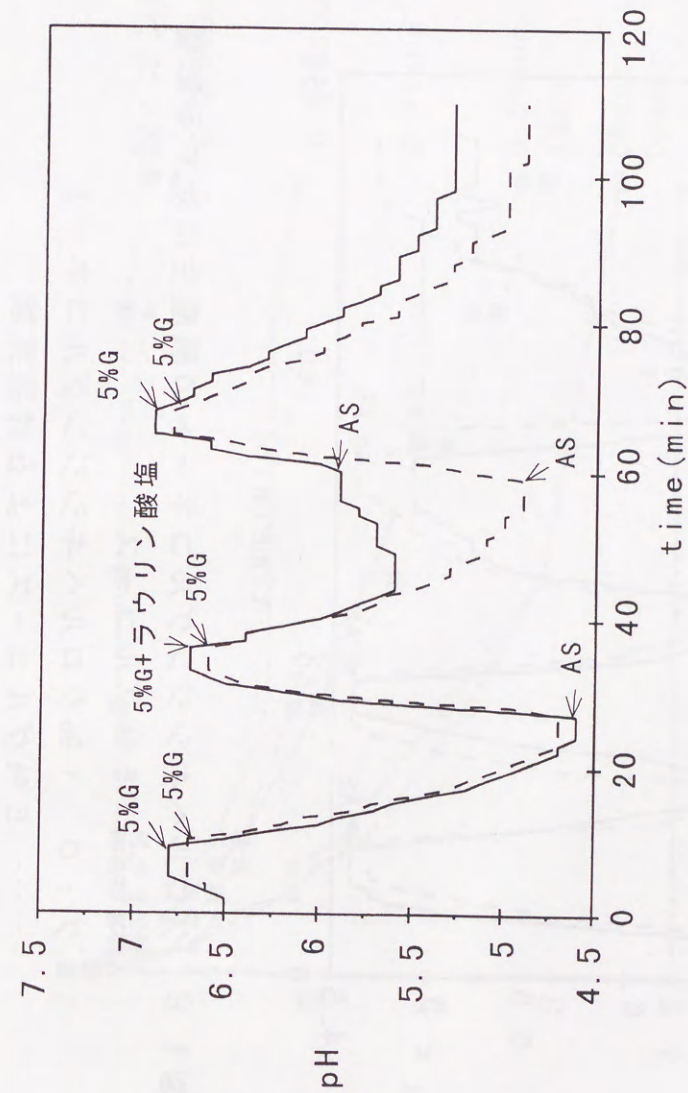


図10 ラウリン酸ナトリウムの酸産生に対する影響

5 % G : 5 % グルコース

ラウリン酸塩 : 0.5mMラウリン酸ナトリウム

----- ラウリン酸塩を含まない5 % グルコースによる対照実験



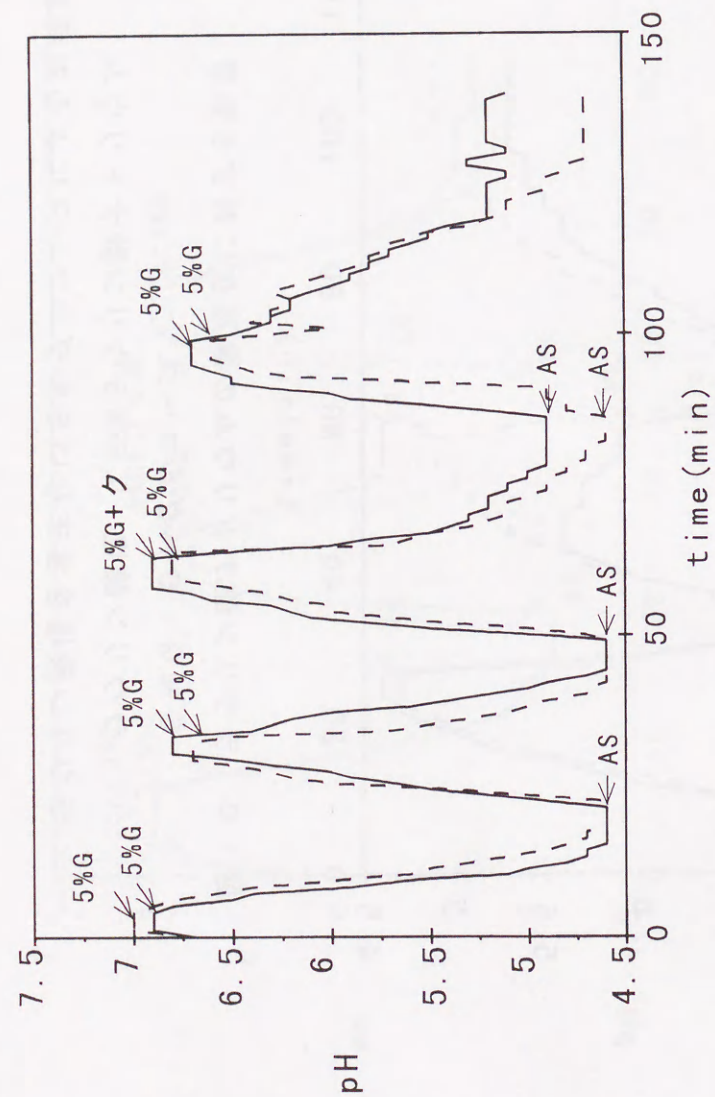


図 11 クロルヘキシジングルコネートの酸産生に対する影響

5% G : 5% グルコース

ク : 0.1% クロルヘキシジングルコネート

----- 5% グルコースによる対照実験

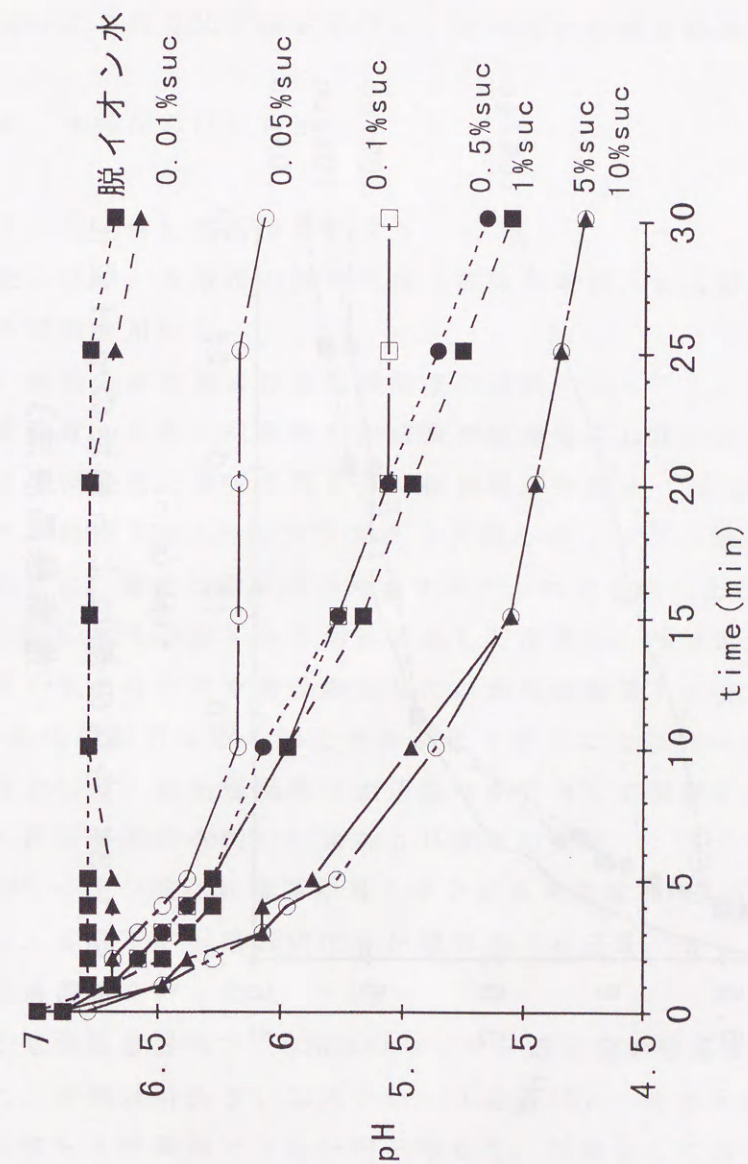


図 12 種々の糖濃度における菌垢の pH 変化

(菌垢懸濁液法)



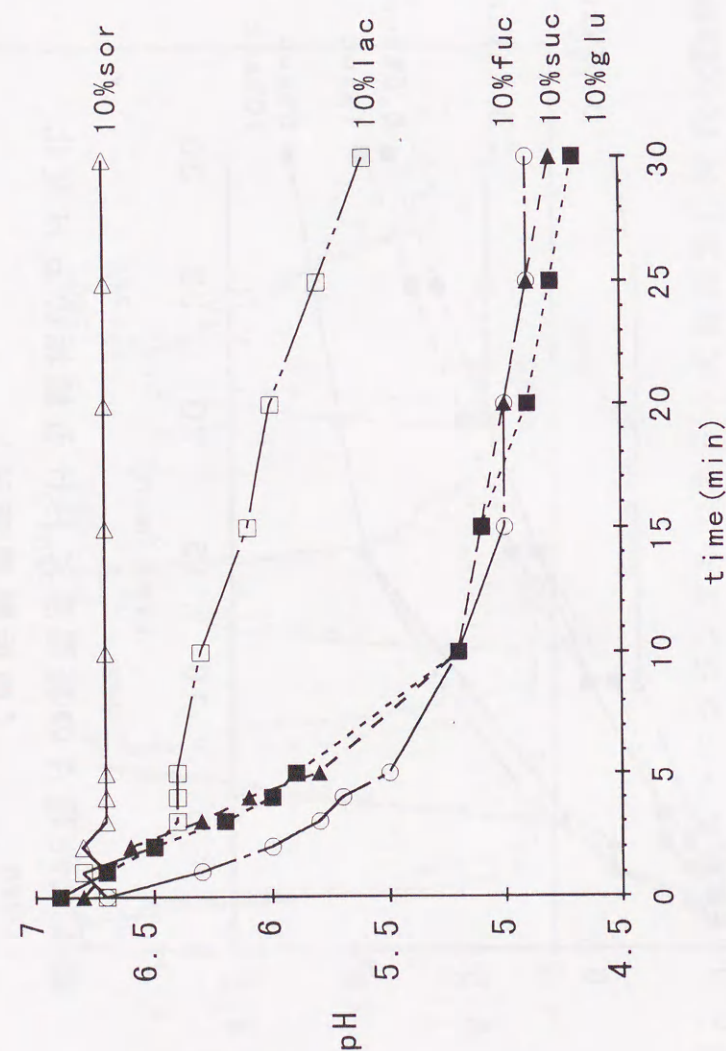


図13 各種の糖による歯垢のpH変化  
(歯垢懸濁液法)

### 第三章 *in vitro*歯垢懸濁液法および*in vivo*電極内蔵法による歯垢における液状試料の酸産生性の評価

本章では、同じ被検試料を用いて*in vitro*歯垢懸濁液法と*in vivo*電極内蔵法の二つの方法で検定を行い、それぞれの検定結果を比較した。

#### 3. 1 材料ならびに方法

##### 3. 1. 1 歯垢懸濁液法による

実験には、15種類の原料素材(甘味料素材)および5種類のシロップ液状感冒剤を用いた。

##### (1) 歯垢の採取および歯垢懸濁液の調整

各被験者(5名)に実験日の前夜は歯磨きをしないように指示した。実験当日の朝食前に歯垢を採取し、歯垢懸濁用溶液(150mM KCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM リン酸緩衝液)入りプラスチック遠心チューブ(氷水中に保存)に歯垢を集めた。集めた歯垢はホモジナイザーによる均一化と、遠心処理(12,000 r.p.m.で3分間)を2回繰り返して洗浄し、唾液成分を除去した。洗浄、遠心後歯垢の湿重量を測定した。歯垢湿重量1mgに対して、1.5μlの歯垢懸濁用溶液を加えホモジナイザーにより均一化した試料を歯垢懸濁液とした。歯垢懸濁液は使用直前まで0℃で保存した。

##### (2) 歯垢懸濁液を用いた歯垢pH変化の測定

pHBOY(イオン感応性電界効果トランジスタ電極ISFET-pHBOY-C1またはP2)を用い、35℃の恒温器内でpH標準液(pH6.86、4.01)を用いて2点調整を行った。

35℃の恒温器内で、pHBOYのセンサー部に歯垢懸濁液8μlを滴下し、さらに、被検試料あるいはスクロース溶液12μlを加え攪拌したのち、そのpH値を1分間隔で30分間記録した。対照としてスクロースのpHが5.0以下まで低下することを確認した。なお、被検試料およびスクロースの最終濃度は10%とした。



### 3. 1. 2 電極内蔵法による測定

#### (1) 被験試料および歯垢下 pH の測定装置

実験には、15種類の原料素材（甘味料素材）、5種類のシロップ液状感冒剤を用いた。

方法1：水素イオン感受性電解効果トランジスタ電極（ISFET pH センサー：PH-6010 日本光電工業）をヒトエナメル質小片に設置し、千田<sup>1)</sup>、高橋<sup>2)</sup>、張ら<sup>3)</sup>の方法に準じて作製したpH測定装置に組み込み、矯正用維持装置（S.T.ロック、三金工業）を用いて上顎右側第一大臼歯頬側面に設置した。

方法2：Yamadaら<sup>4)</sup>、Igarashiら<sup>5)</sup>の方法により、方法1で使用したものと同種の電極をエナメル質小片上に設置し、部分床義歯（下顎第一大臼歯欠損部）に組み込んで作製した。

方法1、2ともに比較電極（PH-8005、日本光電工業）は測定時に前腕部に固定した。

#### (2) 歯垢下 pH の測定

被験者は、未処置齲歯のない成人男性4名（20歳、22歳、24歳、27歳）、女性2名（36歳、40歳）の計6名である。5名の被験者は方法1のとおりに作製した歯垢下pHの測定装置を装着した。1名（女、36歳）の被験者は方法2のとおりに作製した歯垢下pHの測定装置を装着した。歯垢下pH測定装置を口腔内に3～5日間装着し、電極上に歯垢を形成させた後、各種試料摂取後の歯垢pHの変化を30分間にわたり測定した。なお、各種試料10%溶液10mlで2分間、またはシロップ液状薬剤10mlで10秒間洗口することにより実験を開始した。なお、対照として10%スクロース溶液10mlで同様の実験を行った。

### 3. 1. 3 被検試料の緩衝能の測定

緩衝能は酸滴定法により測定した。すなわち、それぞれの被検試料（15種類の原料素材（甘味料素材）の濃度はそれぞれ10%とした）10mlを100ml用ビーカーに入れ、これに0.1NHClを0.1mlずつ加えてよく混合して、pH値をpHBOYで測定した。

### 3. 2 結果

(1) *in vitro*歯垢懸濁液法および*in vivo*電極内蔵法による各種原料素材（甘味料素材）の歯垢における酸産生性の評価

15種類の原料素材（甘味料素材：糖アルコールなども含む）について検討を行った。歯垢懸濁液法で酸産生性を測定するとともに各試料を用いて電極内蔵法によりヒト歯垢下pHの測定を行った。その結果、電極内蔵法での歯垢の最低pHと歯垢懸濁液法の最低pHの間には、正の強い相関関係（相関係数 $R=0.90$ ）が認められた（図1）。ただし、*in vitro*歯垢懸濁液法により得られた最低pHの値は、*in vivo*電極内蔵法で得られた最低pHの値より低い傾向が見られた。

(2) *in vitro*歯垢懸濁液法および*in vivo*電極内蔵法によるシロップ液状感冒剤および甘味料素材の歯垢における酸産生性の比較

図2（○）に示したように、歯垢懸濁液法においては、今回用いたシロップ液状感冒剤すべてにおいてそれぞれの歯垢の最低pHは5.4以下には低下しなかったが、電極内蔵法ではすべてのシロップ液状薬剤において歯垢の最低pHが5.2以下になった<sup>6)</sup>。すなわち、電極内蔵法では著しくpHの低下が認められたシロップ液状感冒剤でも、歯垢懸濁液法では酸産生性が極めて低く評価されてしまうことがわかった（表1）。このことは、図2（■）に示したように各種原料素材（甘味料素材）ではまったく認められなかった。

#### (3) 被検試料の緩衝能

シロップ液状感冒剤について、酸滴定法により緩衝能を検討した。その結果、今回用いたシロップ液状感冒剤には著しく高い緩衝能があることがわかった（図3）。そして、同じ方法で15種類の原料素材（甘味料素材）の緩衝能を検討したがこれらはすべて緩衝能をもたないことがわかった（図3）。

(4) スクロース溶液に緩衝液を加えた場合と加えなかった場合の、*in vitro*歯垢懸濁液法および*in vivo*電極内蔵法による歯垢pHの変化の比較  
リン酸緩衝液（30mM, pH 7.0）を加えた10%スクロース溶液で洗口し



た場合でも、緩衝液を含まないスクロース溶液で洗口した場合でも歯垢下 pH の低下には変わりのないことが、電極内蔵法を用いた実験より明らかになった（図 4-1）。しかし、歯垢懸濁液を用いた実験では緩衝液を含んだ場合に pH の低下が著しく抑制されることがわかった（図 4-2）。実験によって得られた pH 変化曲線をもとに最低 pH 値、pH 6.5 以下の面積、pH 6.0 以下の面積、pH 5.5 以下の面積および水素イオン濃度の総和を求めた（表 2）。歯垢懸濁液法では、緩衝液を含むスクロース溶液の方が緩衝液を含まないものよりも歯垢の最低 pH 値が高く、pH 5.5 以下の面積、pH 6.0 以下の面積、pH 6.5 以下の面積値が小さいことがわかった。また、水素イオン濃度の総和についても緩衝液を加えたスクロース溶液の方がはるかに小さい値を示した。一方、電極内蔵法で検討した場合には、スクロース溶液にリン酸緩衝液を加えても加えなくても、酸産生性に関しては、いずれの評価基準を用いて検討を行っても有意差がないことが判明した。また、リン酸緩衝液のかわりに MOPS 緩衝液を用いた場合にも上述と同じ結果が得られた（図 5）。

### 3. 3 考察

本研究では同一の液体被検試料を用いて、*in vitro* 歯垢懸濁液法と *in vivo* 電極内蔵法の二つの方法で検定を行い、比較検討した。その結果、食品の原料素材や甘味料素材を被検試料とした場合には、二つの方法で測定した最低 pH の間に正の相関関係があることが明らかになった。このことから、歯垢懸濁液法により酸産生性が高いと判断された原料素材や甘味料素材は *in vivo* 電極内蔵法によっても高い酸産生性を示すことが示唆された。さらに歯垢懸濁液法には操作が簡便でかつ短時間で測定が可能であるという利点がある。ただし、歯垢懸濁液により得られた最低 pH 値は、電極内蔵法での最低 pH より低い傾向があることが観察された。この違いはヒト口腔内の生理状態を考えてみることにより説明される。*in vivo* 電極内蔵法ではヒト口腔内における唾液の流出による洗浄作用、緩衝作用<sup>7)</sup>などの口腔機能が十分に反映された環境のもとで、歯垢下 pH の測定を行うことができるのに対して、今回用いた歯垢懸濁液法では緩衝能がほとんど

ない条件下で酸が産生され、そして産生された酸が一定の容器の中で蓄積されていくという違いがある。

一方、緩衝能のあるシロップ液状感冒剤や緩衝液を加えたスクロース溶液の酸産生性を二つの方法で比較検討し、それぞれの方法で測定した最低 pH の間には相関関係はまったく認められなかった。すなわち、*in vivo* 電極内蔵法で高い酸産生性が認められた薬剤でも、*in vitro* 歯垢懸濁液法ではその緩衝能により（図 2）、見かけ上極めて小さい酸産生性として測定された（表 1、表 2、図 4）。このことから、緩衝能を有する試料の場合には、*in vitro* 歯垢懸濁液法では実際の歯垢中の pH 変化を反映しないことがわかった。これに対して *in vivo* 電極内蔵法では、ある程度緩衝能を有する液状試料であっても、歯垢 pH に影響を与えず、食品の酸産生性が反映されるという利点があることが判明した。

ところで、繰り返しになるが、食品の原料素材など緩衝能がないと考えられる試料では、*in vitro* 歯垢懸濁液法の結果と *in vivo* 電極内蔵法の結果には、強い正の相関関係が認められた。そこで、緩衝能に関して十分に検討を重ね、緩衝能をもたないと判断された被検試料の酸産生を考える場合には *in vivo* 歯垢懸濁液法も大きな意義をもつと考えられる。ただし、前述したように、ヒト歯垢 *in situ* の状態を再現するものではないので、*in vitro* 歯垢懸濁液法により得られた結果は、*in vivo* 電極内蔵法を行う以前の目安的な検討、原料素材の酸産生に関する目安的な検討を行う場合に利用されるべきと考えられる。すなわち、スクリーニング的に酸産生性を検討するために用いられるべきと考えられる。

### 参考文献

- 1) 千田隆一：電極内蔵法による小児および成人での歯垢内酸産生能に関する研究 I. 歯垢下 pH 測定装置と電極表面に形成された歯垢の走査電子顕微鏡による観察。小児歯科雑誌 22: 125-136, 1984.
- 2) 高橋信博：電極内蔵法 (In-dwelling electrode method) を用いた歯垢の糖代謝活性の測定。東北大学歯学雑誌 6: 91-98, 1987.



- 3) 張 平, 阿部一彦, 山田 正: 日本で市販されている口中錠の歯垢内酸産生性 - 電極内蔵法による歯垢 pH の測定 -. 東北大学歯学雑誌 14: 75-81, 1995.
- 4) Yamada, T., Igarashi K. and Mitsutomi M.: Evaluation of cariogenicity of glycosylsucrose by a new method to measure pH under human dental plaque *in situ*. J. Dent. Res. 59: 2157-2152, 1980.
- 5) Igarashi, K., Kamiyama, K. and Yamada, T.: Measurement of pH in human dental plaque *in vivo* with an ion-sensitive transistor electrode. Arch. Oral Biol. 26: 203-207, 1980.
- 6) 尹 梅, 阿部一彦, 山田 正: 日本で市販されている小児用シロップ液状総合感冒剤の歯垢内酸産生性. 東北大学歯学雑誌 15: 165-172, 1996.
- 7) Edgar, W. E.: The role of saliva in the control of pH changes in human dental plaque. Caries Res. 10: 241-254, 1976.

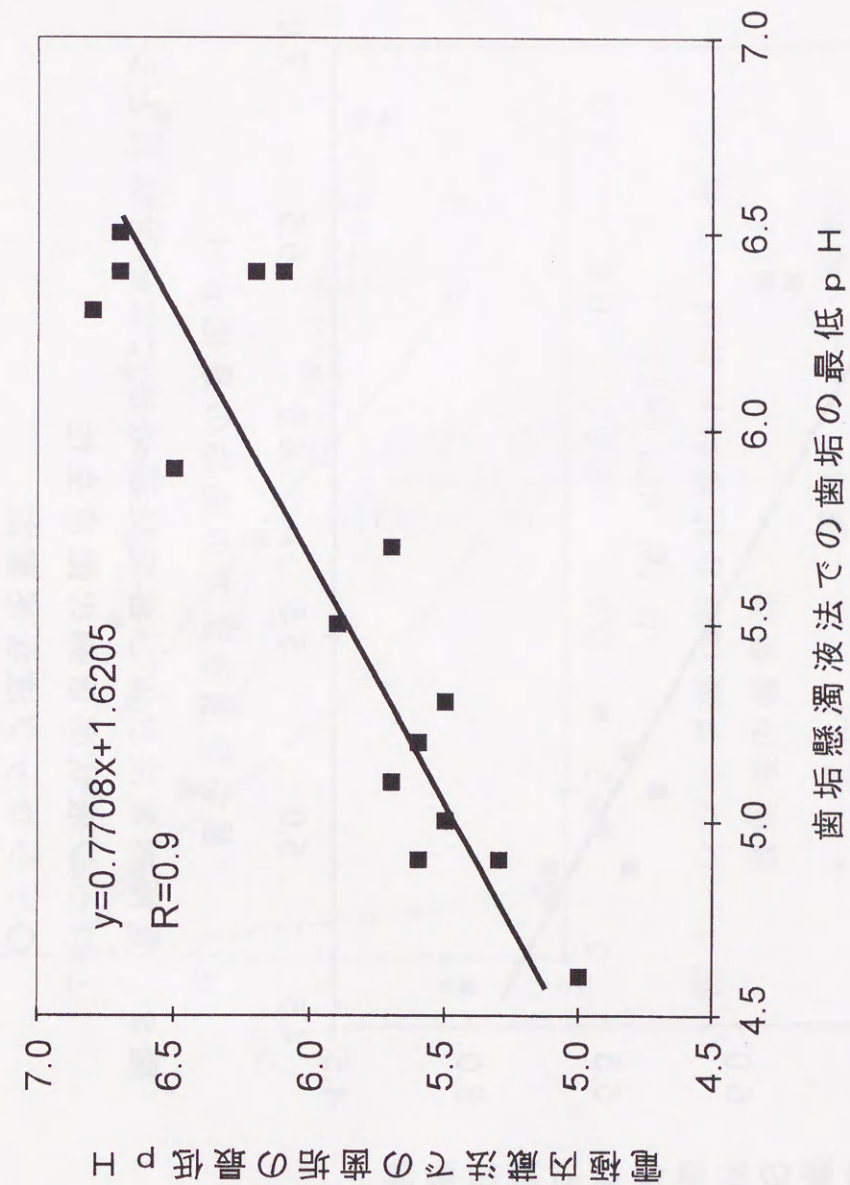


図1 電極内蔵法および歯垢懸濁液法での歯垢の最低 pH



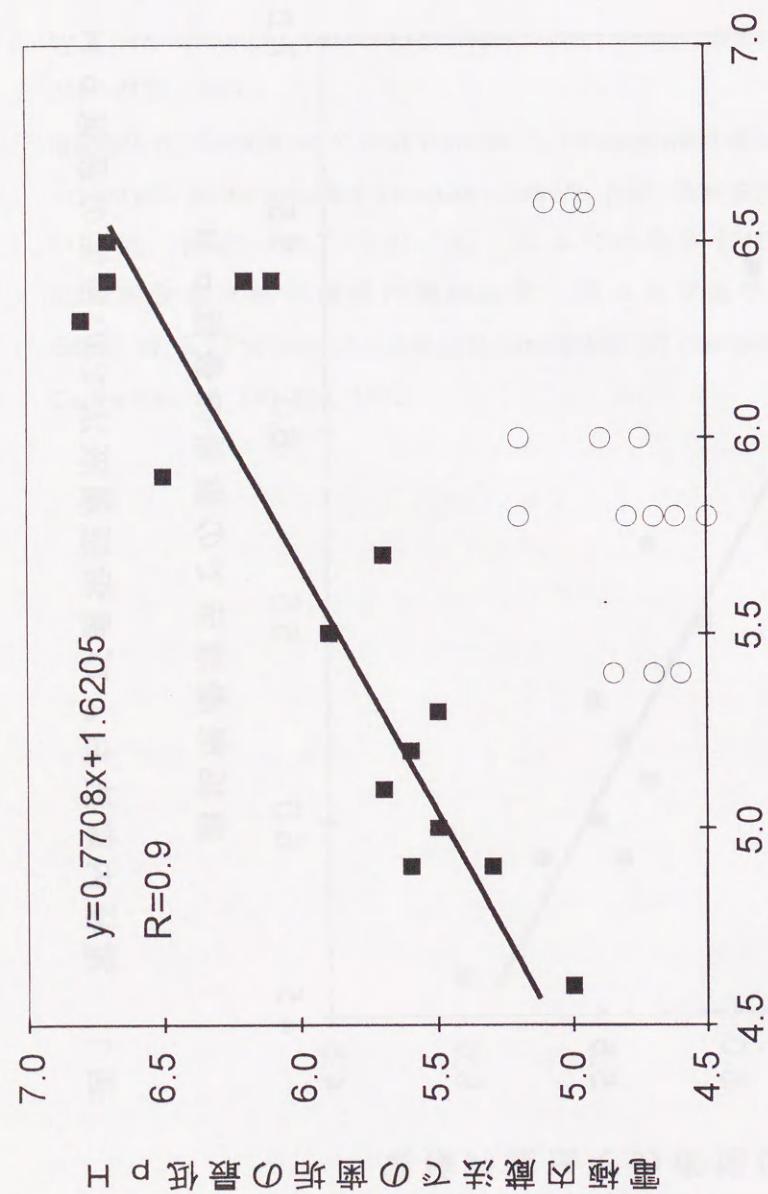


図2 電極内蔵法および菌垢懸濁液法による甘味料とシロップ液状感胃剤の酸産生性

○ : シロップ液状感胃剤

■ : 10% 甘味料

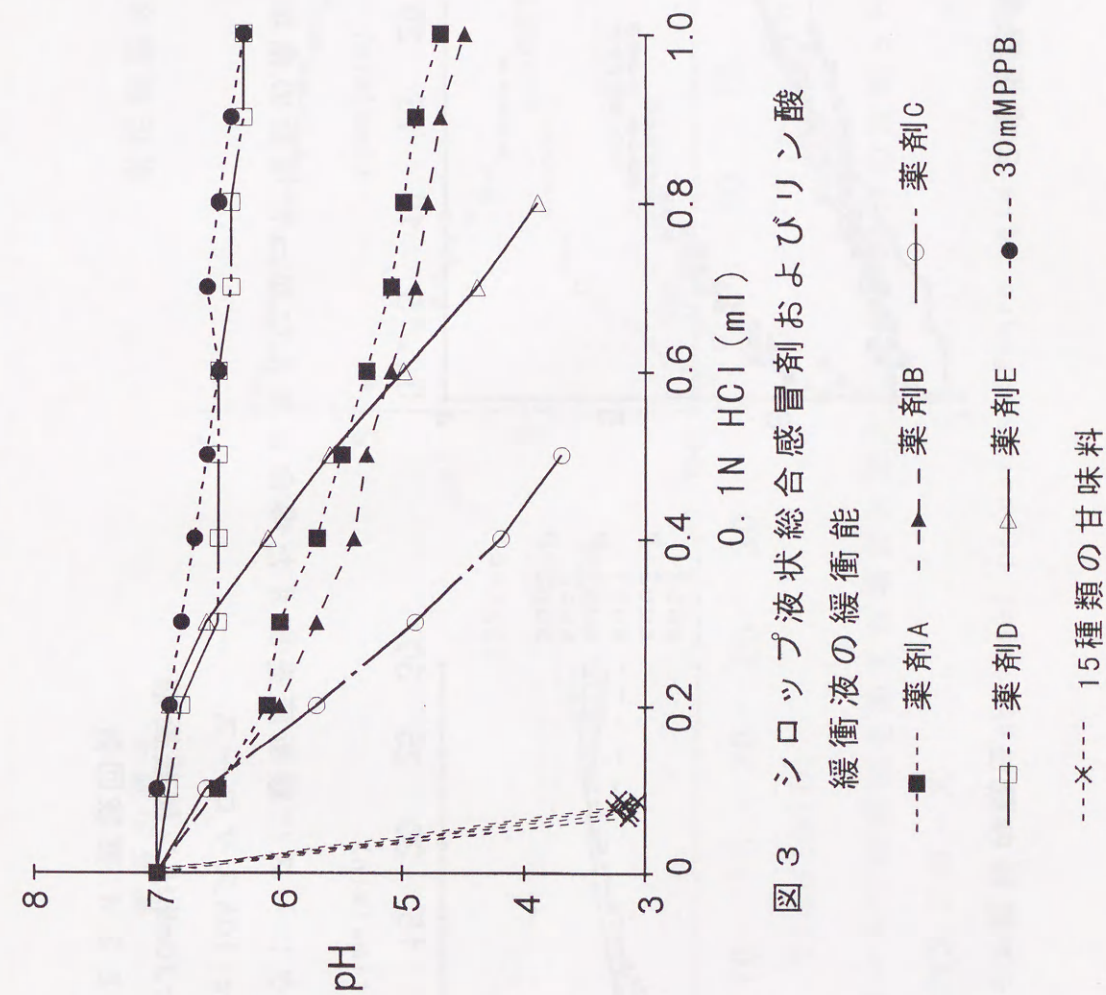


図3 シロップ液状総合感胃剤およびリン酸緩衝液の緩衝能

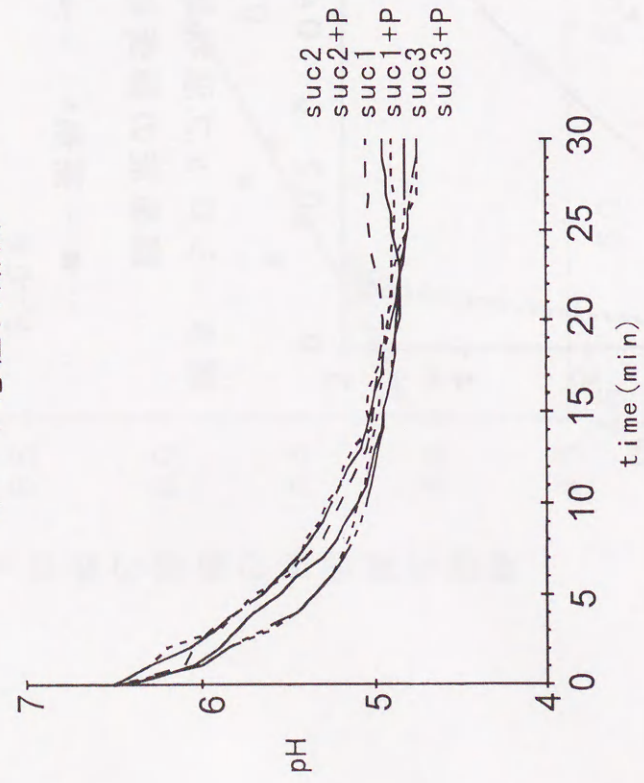
---■--- 薬剤A    ---□--- 薬剤B    —○— 薬剤C

—△— 薬剤D    ---●--- 30mMPPB

---x--- 15種類の甘味料



#### 4-1 電極内蔵法



#### 4-2 菌垢懸濁液法

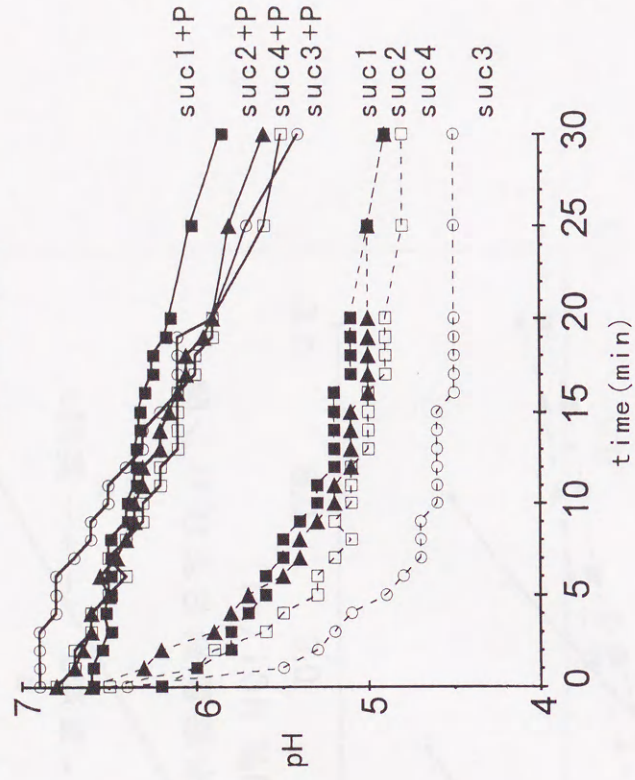


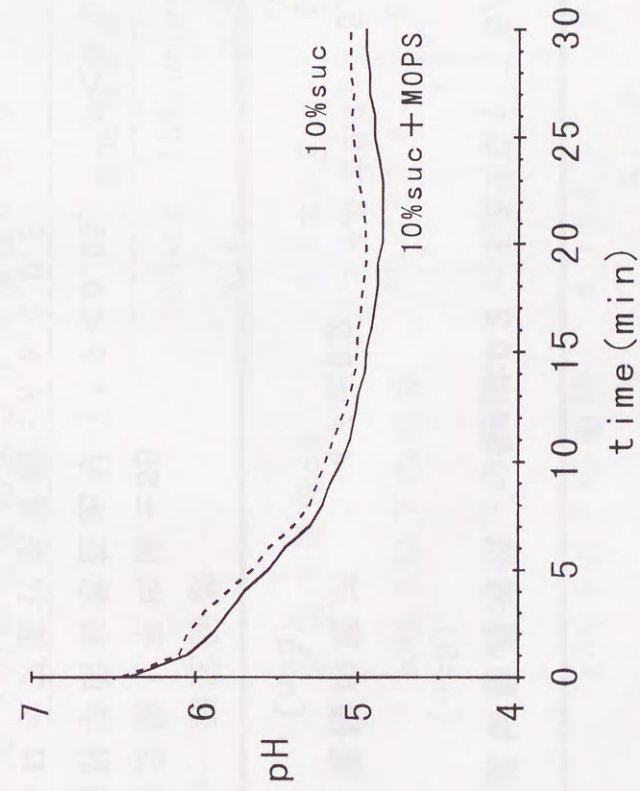
図4 スクロースに緩衝液を加えた場合と加えなかった場合の菌垢 pH

suc: 10% スクロース

P: 30mM リン酸緩衝液

1, 2, 3, 4: 実験回数

#### 電極内蔵法



#### 菌垢懸濁液法

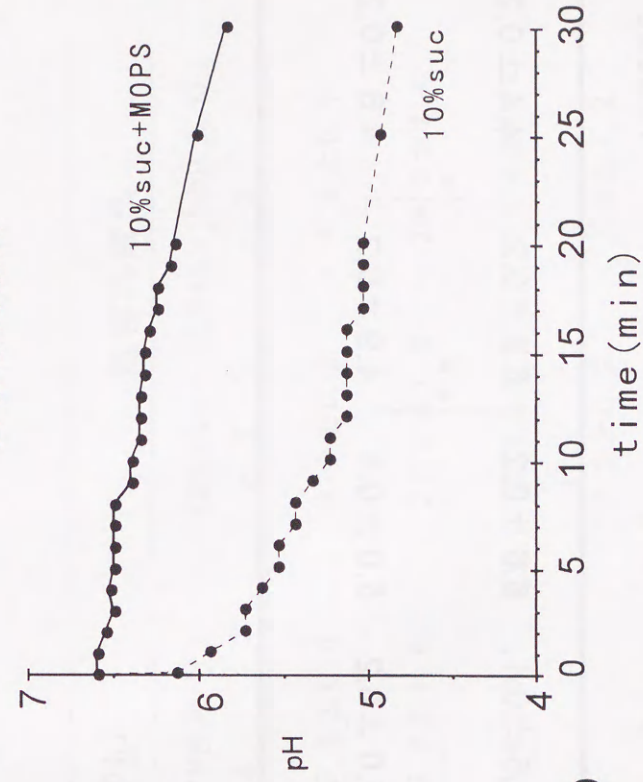


図5 スクロースに緩衝液を加えた場合と加えなかった場合の菌垢 pH

suc: 10% スクロース

MOPS: 50mM 3-(N-Morpholino) propanesulfonic acid-NaOH 緩衝液



表 1 シロップ液状総合感冒剤を歯垢懸濁液法および電極内蔵法で検定した場合の歯垢の最低 pH

|                 | A         | B         | C         | D         | E         | 10%suc    |
|-----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 歯垢懸濁液法<br>(n=3) | 5.4 ± 0.2 | 5.7 ± 0.1 | 5.5 ± 0.1 | 6.6 ± 0.2 | 5.7 ± 0.2 | 4.4 ± 0.2 |
|                 | *         | *         |           |           | **        | *         |
| 電極内蔵法<br>(n=3)  | 4.7 ± 0.2 | 4.6 ± 0.1 | 5.0 ± 0.2 | 5.0 ± 0.1 | 4.9 ± 0.2 | 4.6 ± 0.2 |

n: 測定回数

測定値: 平均値 ± SD

統計学的有意差あり (\* P<0.05, \*\* P<0.01)

シロップ液状感冒剤: A, B, C, D, E

10%suc: 10%スクロースをコントロールとした。

表 2 緩衝液を加えた場合と加えなかった場合の歯垢の最低pH, 歯垢pH5.5, 6.0, 6.5以下の面積値および水素濃度の総和

|  | 歯垢懸濁液法                            |                      | 電極内蔵法                              |                      |
|--|-----------------------------------|----------------------|------------------------------------|----------------------|
|  | 10%suc<br>n:4                     | 10%suc(PPB入り)<br>n:4 | 10%suc<br>n:3                      | 10%suc(PPB入り)<br>n:3 |
| 歯垢の最低pH                                    | 4.8 ± 0.2                         | 5.6 ± 0.3            | 4.9 ± 0.2                          | 4.8 ± 0.1            |
|  |                                   | **                   |                                    |                      |
| pH6.5以下の面積                                 | 30.0 ± 7.8                        | 5.3 ± 1.8            | 27.5 ± 1.6                         | 28.3 ± 2.0           |
|  |                                   | **                   |                                    |                      |
| pH6.0以下の面積                                 | 19.0 ± 7.7                        | 0.8 ± 0.5            | 16.6 ± 1.5                         | 17.4 ± 1.7           |
|  |                                   | **                   |                                    |                      |
| pH5.5以下の面積                                 | 9.1 ± 6.7                         | 0                    | 7.3 ± 0.9                          | 7.9 ± 1.2            |
|  |                                   | **                   |                                    |                      |
| 水素イオン濃度総和(23.1 ± 11)<br>× 10 <sup>-5</sup> | (1.5 ± 0.4)<br>× 10 <sup>-5</sup> |                      | (16.1 ± 1.6)<br>× 10 <sup>-5</sup> |                      |
|  | *                                 |                      | (17.6 ± 2.2)<br>× 10 <sup>-5</sup> |                      |

統計学的有意差あり (\*p<0.05, \*\*p<0.01)



#### 第四章 日本で市販されている小児用シロップ液状総合感冒剤の歯垢内酸産生性

錠剤などを飲み込むことのできない8歳までの小児を対象として、シロップ液状総合感冒剤が用いられている。処方によれば、これらの感冒剤は一日3～6回さらに就寝前にも服用することが指示されている。そこで、一日のうちにこのように頻回服用される甘味料を含む薬剤服用後の歯垢のpHの変化に関して、齲蝕誘発性という観点から興味をもたれた。

シロップ液状薬剤には、甘味料としてスクロースなどが含まれるので、歯垢中の細菌がこのスクロースを分解して産生する酸により齲蝕誘発性が高くなることが示唆されている<sup>1～3)</sup>。また、高濃度のスクロースを含むシロップ系薬剤を服用した小児には、著しい齲蝕の増加がみられることが報告されている<sup>4, 5)</sup>。さらに、発酵性の糖を頻繁に摂取すると齲蝕の発生率が高くなることが知られている<sup>6～12)</sup>。しかし、シロップ系薬剤摂取後のヒトの歯垢pHの変化についての報告はきわめて少ない。1977年スイスで販売されていたせき止めシロップ薬剤を服用した後のヒト歯垢内酸産生性についての報告があるのみである<sup>13)</sup>。また、日本では、口中錠（トローチ状薬剤）を服用したときの歯垢の酸産生性<sup>14)</sup>について報告されているが、シロップ液状薬剤服用時の歯垢pHに関する報告はない。そこで、本研究では、日本で市販されているシロップ液状総合感冒剤の服用時の齲蝕誘発性を考えるために、これらのシロップ液状薬剤の服用による歯垢の酸産生性について、電極内蔵法を用いて検討した。

##### 4. 1 材料および方法

###### 1) シロップ液状総合感冒剤中のスクロースおよびグルコース濃度の測定

10社により販売されている12種類のシロップ液状総合感冒剤中のスクロースおよびグルコース濃度をヘキソキナーゼ、 $\beta$ -フラクトシダーゼおよびグルコース6-リン酸脱水素酵素を組み合わせた酵素法（F-キット、ベーリンガー・マンハイム株式会社）により測定した。

##### 2) 電極内蔵法

###### (1) 被検試料および歯垢下pH測定装置

上記の実験により、スクロースを含有していると判定された10種類のシロップ液状総合感冒剤より、無作為に選択した5社5種類とスクロースを含有していないと判定された1社2種類の薬剤について電極内蔵法により検討した。

方法1：水素イオン感受性電解効果トランジスター電極（ISFET-pHセンサー：PH-6010：日本光電工業）をエナメル質小片に設置し、千田<sup>15)</sup>、高橋<sup>16)</sup>、張ら<sup>14)</sup>の方法に準じて作製したpH測定装置に組み込み、矯正用維持装置（S.T.ロック、三金工業）を用いて上顎右側第一大臼歯頬側に装着した。3～4日間装着し、電極に歯垢が蓄積した後、pHの測定を行った。

方法2：Yamadaら<sup>17)</sup>、Igarashiら<sup>18)</sup>の方法により、ISFET-pHセンサーをエナメル質小片上に設置し、電極を部分床義歯（下顎右側第一大臼歯に欠損）に組み込んで作製した。口腔内に3～4日間装着し、pH電極に歯垢が蓄積した後、pHの測定を行った。

方法1、2ともに、比較電極（PH-8005：日本光電工業）は測定時に前腕部に固定した。

###### (2) 被験者および歯垢下pH測定

未処置齲歯のない2名の男性（被験者1：25歳、被験者2：20歳）および1名の女性（被験者3：35歳）を被験者とし、被験者1および2は方法1のとおりに作製した歯垢下pHの測定装置を装着した。被験者3は方法2のとおりに作製した歯垢下pHの測定装置を装着した。各被験者には、歯垢蓄積期間中、常に装置を装着し、日常の飲食習慣を変えないように指示した。実験当日の測定開始3時間前からは水以外の飲食物を摂取しないように指示し、pH測定装置を装着して3～4日後に測定を行った。ISFET-pHセンサーおよび比較電極を専用のpHメータ（ISFET mV/pHメータ：新電元工業）に接続し、歯垢pHの変化を連続的に記録した。パラフィン（Parafilm: American National Can）を噛むことにより唾液を分泌させ、歯垢のpHを安定化させた。歯垢pH値が十分に安定してから、シロ



ップ液状薬剤または10%スクロース溶液をそれぞれ10秒間洗口し、歯垢pHの変化を30分間連続的に測定した。測定終了後、電極周辺の歯垢を除去し、標準緩衝液を用いてpHの校正を行った。

### 3) シロップ液状総合感冒剤で洗口後の唾液中のスクロース濃度の測定

#### (1) 唾液の採取

被験者には、測定開始2時間前から、飲食物を摂取しないように指示した。口腔清掃後、安静時唾液を採取した。次に、シロップ液状薬剤10mlで10秒間洗口し、吐き出させた。洗口直後(0)から、1, 2, 3, 5, 10, 20, 30分後に唾液を採取した。吐き出させた唾液を脱イオン水で10倍に希釈し、10, 000rpmで3分間遠心した後、測定するまで上清を入れた試験管を氷水中に保存した。

#### (2) 唾液中の糖濃度の測定

酵素法(F-キット、ベーリンガー・マンハイム株式会社)により、唾液中のスクロース濃度を測定した。

### 4) シロップ液状総合感冒剤で洗口後の唾液pHの測定

被験者には、測定開始2時間前から、飲食物を摂取しないように指示した。安静時唾液を採取した後、薬剤10mlで10秒間洗口し、吐き出した直後(0)および1, 2, 3, 5, 10, 20, 30分後に唾液のpHをイオン感应性電界効果型トランジスタ方式pH計、pHBOY(新電元工業株式会社製)で測定した。

### 5) シロップ液状総合感冒剤Aで洗口後、水で洗口した場合の歯垢pHの測定

薬剤10mlで10秒間洗口して吐き出した後、水20mlで20秒間ずつ2~4分の間隔をあげ、7回洗口し、電極内蔵法により、歯垢pHの変化を測定した。

## 4. 2 結果

### 1) シロップ液状総合感冒剤中のスクロース含有量の測定

10社、12種類のシロップ液状総合感冒剤のスクロース含有量を酵素法で定量した結果を表1に示した。9社、10種類のシロップ液状総合感

冒剤には、スクロースが23%から48%と高濃度に含まれていたが、1社で製造販売されている2種類のシロップ液状総合感冒剤にはスクロースもグルコースも含まれていなかった。

### 2) シロップ液状総合感冒剤洗口後の歯垢pHの変化

スクロースを高濃度に含む10種類のシロップ液状総合感冒剤から無作為に抽出した5種類について、それぞれ3名ずつの被験者で洗口を行うことにより、電極内蔵法でヒトの歯垢pHの測定を行った(図1)。シロップ液状総合感冒剤(A~E)10mlで10秒間洗口した場合の30分間における歯垢の最低pHは4.5~5.2であり、酸産生性が極めて高いことがわかった。また、2種類のシュガーフリーの液状総合感冒剤(K, L)を用いて検討したところ、歯垢の最低pHは6.0~6.5であった(図1, 被験者2, 被験者3)。それぞれのシロップ液状総合感冒剤を洗口したときの歯垢の最低pHを表2に示した。スクロースを含有しているシロップ液状総合感冒剤では、エナメル質が溶け出すと考えられる臨界pH5.5以下に歯垢のpHを低下させるに対し、シュガーフリーである2種類のシロップ薬剤ではいずれも臨界pH5.5以下に低下させることはなかった。

### 3) シロップ液状総合感冒剤で洗口後の唾液中のスクロース濃度、唾液および歯垢pHの変化

図2にシロップ液状総合感冒剤10mlで洗口後の唾液中のスクロース、唾液pHおよび歯垢pHの変化を示した。シロップ液状薬剤を摂取直後に唾液pHは一時的に低下したが、きわめて短時間のうちに唾液pHは中性付近に戻った。また、唾液中のスクロース濃度は洗口直後に急激に低下し、10分後にはほとんど消失したが、歯垢pHはその後徐々に低下し、pH低下は30分後の測定終了時まで続いた。

### 4) シロップ液状総合感冒剤による歯垢のpH変化に対する水による洗口の影響

薬剤A10mlで10秒間洗口後に、水道水20mlで20秒間ずつ7回洗口させた場合でも、水で洗口しなかったときに比べて、歯垢pHの低下を抑制することはできなかった(図3)。



#### 4. 3 考察

日本で市販されているシロップ液状総合感冒剤（10社12種類）のスクロース含有量について検討したところ、9社10種類にはスクロースが高濃度（23%～48%）に含まれており、1社で製造されている2種類にはスクロースもグルコースも含まれていないことがわかった（表1）。そこで、スクロースを含有している10種類のシロップ液状薬剤から無作為に抽出した5社5種類とシュガーフリーであることがわかった1社2種類のシロップ液状総合感冒剤の歯垢における酸産生性について、摂取後30分間にわたり電極内蔵法で検討した。その結果、スクロースを高濃度に含む5社5種類の薬剤では、歯垢pHがエナメル質が溶け出すと考えられる臨界pH（pH5.5）以下に低下することがわかった（図1、表2）。しかし、シュガーフリーの1社2種類の製品KとLではほとんど歯垢pHの低下が認められなかった（表2）。

先に張ら<sup>14)</sup>は、日本で市販されている口中錠の服用時の歯垢pHの変動に関して報告し、口中錠をなめている間、長期にわたり唾液中に溶出したスクロースなどが歯垢微生物によって分解されて酸を生ずる点を論じた。しかし、今回はシロップ液状総合感冒剤をわずか10秒間洗口するだけでも、直後より長期にわたり歯垢pHの低下が継続することが判明した。洗口した後の唾液中のスクロース濃度を経時的に定量したところ、唾液中のスクロース濃度は急激に減少し、10分後には唾液中にほとんどスクロースが検出されないことがわかった。しかし、10分以降においても歯垢のpHはさらに低下し続けた（図2）。また、シロップ液状総合感冒剤での洗口直後に水で洗口した場合には唾液中のスクロースは7分以内に消失したが、このときにも歯垢のpH低下を抑制することはできなかった（図3）。以上のことより、持続する歯垢pHの低下の基質となるのは、唾液中から供給され続けるのではなく、スクロースを基に短時間のうちに歯垢中または菌体内に貯蔵され、その後酸産生基質となる物質であると考えられた。口腔連鎖球菌ではスクロースを基質として、グリコーゲン様多糖を菌体内に蓄積すること<sup>19)</sup>、そして、連鎖球菌は蓄積した菌体内グリコーゲン様

多糖を分解して酸を産生し続けることが知られている<sup>(20, 21)</sup>。著者らもスクロース洗口直後の歯垢中にヨウ素で染色される多糖様物質が存在することを確認した（データ未発表）。すなわち、唾液中のスクロースが流失しても、歯垢の菌体内に合成された多糖が炭素源となり、歯垢pHが低下し続けたと考えられた。口腔内における停留時間がきわめて短いと考えられていた液状物質を摂取した場合においても、歯垢pHの低下が持続し続けることは、種々の飲食物の歯垢における酸産生性を考えるとき、きわめて重要な意味をもつものと考えられた。

シロップ液状総合感冒剤を服用した後の歯垢pH低下を防止する方法を模索するために、水での洗口が歯垢pHの変動にどのような影響をもたらすかについて検討した。しかし、繰り返し水で洗口しても歯垢pHの変動にはほとんど影響が認められず、水による洗口では歯垢pHの低下を抑制できないことが判明した（図3）。Hoshinoら<sup>22)</sup>は10%スクロース水溶液で洗口した後は、水でうがいしても歯垢pHを回復させることが困難であると報告している。また、Dawesら<sup>23)</sup>もスクロースの齲蝕誘発能を決定するのは、摂取するスクロースの濃度であり、スクロース摂取後に水で洗口してもそれほどの効果は期待できないと述べている。シロップ系薬剤は錠剤を飲み込むことができない小児を対象として用いられており、今回検討したシロップ液状総合感冒剤以外にも、抗生物質製剤、去痰製剤、ビタミン製剤、抗アレルギー製剤など数多くの種類のシロップ系薬剤が存在する。また、小児に対して薬剤服用の動機づけを行うためには、甘味料を用いて小児の好む味にする必要があると考えられる。ところで、現在、飴やガムなど多くの菓子類にはスクロースを全く含まず、その代わりに歯垢による酸産生性の基質となりにくい種々の代替甘味料が用いられている。また、スイスやフィンランドなどでは、シロップ系薬剤の甘味料として非あるいは低発酵性代替甘味料が使用されている<sup>3, 24～27)</sup>。今回の検討でもスクロースやグルコースなどを含まない液状総合感冒剤の場合には、歯垢における酸産生がほとんどみられないことがわかった（表2）。そして、スクロースを高濃度（23%～48%）に含むシロップ液状総合感冒剤の歯垢による酸産生性を、水での洗口では抑制できなかったことなどを考慮



すると、齲蝕発生の危険性を未然に防ぐためにも、含有されている発酵性の成分を非発酵性または発酵性のきわめて低い成分に置き換えるべきと考えられる。

#### 参考文献

- 1) Lokken, P., Birkeland, J. M., Sannes, E.: pH changes in dental plaque caused by sweetened, iron containing liquid medicine. *Scand. J. Dent. Res.* 83: 279-283, 1975.
- 2) Feigal, R. J., Jensen, M. E., Mensing, C. A.: Dental caries potential of liquid medications. *Pediatrics*. 68: 416-419, 1981.
- 3) Rekola, M.: In vivo acid production from medicines in syrup form. *Caries Res.* 23: 412-416, 1989.
- 4) Roberts, I. F., Roberts, G. J.: Relation between medicines sweetened with sucrose and dental disease. *Br. Med. J.* 2: 14-16, 1979.
- 5) Maguire, A., Rugg-Gunn, A. J. and Butler, T. J.: Dental health of children taking antimicrobial and non-antimicrobial liquid oral medication long-term. *Caries Res.* 30: 16-21, 1996.
- 6) 山田 正：齲蝕と食餌—どのような食品が齲蝕を起こすか—。歯界展望 別冊 119-131, 1982.
- 7) 山田 正：「むし歯にならない」との表示はどのように決められるべきか—食品の齲蝕誘発性の検定基準の設定に関する国際的動向—。歯界展望 77(6):1379-1380, 1991.
- 8) Grenby, T. H.: Nutritive sucrose substitutes and dental health. Parker, K. J. and Lindley, M. G. (edit.): *Developments in Sweeteners*. Applied Science Publishers Press, London, 1983, pp. 51-88.
- 9) Higginbotham, J. P.: Recent developments in non-nutritive sweeteners. Grenby, T. H., Parker, K. J. and Lindley, M. G. (edit.): *Developments in Sweeteners*. Applied Science Publishers Perss, London, 1983, pp. 119-155.
- 10) Rugg-Gunn, A. J.: Diet and dental caries. Murray, J. J. (edit.): *The Prevention of Dental Disease*. University Press, Oxford, 1983, pp. 3-82.

- 11) Andlaw, R.J.: Diet and dental caries - a review. *J. Hum. Nutr.* 31: 45-52, 1977.
- 12) Bascd.: Sugar and dental caries - a policy statement. British Association for the Study of Community Dentistry. 1982.
- 13) Imfeld, T. H.: Kariogene Hustenspezialitäten. *Schweiz Monatsschr. Zahnheilkd.* 87: 773-777, 1977.
- 14) 張 平, 阿部一彦, 山田 正：日本で市販されている口中錠の歯垢内酸産生性—電極内蔵法による歯垢 pH の測定—。東北大学歯学雑誌 14: 75-81, 1995.
- 15) 千田隆一：電極内蔵法による小児および成人での歯垢内酸産生能に関する研究 I. 歯垢下 pH 測定装置と電極表面に形成された歯垢の走査電子顕微鏡による観察。小児歯科雑誌 22: 125-136, 1984.
- 16) 高橋信博：電極内蔵法 (In-dwelling electrode method) を用いた歯垢の糖代謝活性の測定。東北大学歯学雑誌 6: 91-98, 1987.
- 17) Yamada, T., Igarashi K. and Mitsutomi M.: Evaluation of cariogenicity of glycosylsucrose by a new method to measure pH under human dental plaque in situ. *J. Dent. Res.* 59: 2157-2152, 1980.
- 18) Igarashi, K., Kamiyama, K. and Yamada, T.: Measurement of pH in human dental plaque in vivo with an ion-sensitive transistor electrode. *Arch. Oral Biol.* 26: 203-207, 1980.
- 19) Walker, G. J. and Jacques, N. A.: Polysaccharides of oral streptococci. Reizer, A., Peterkofsky, A. (edit.): *Sugar Transport and Metabolism in Gram-Positive Bacteria*. Ellis Horwood Press, Chichester, 1987, pp. 39-68.
- 20) Minah, G. E., and Loesche, W. J.: Sucrose metabolism in resting cell suspensions of caries-associated and non-caries-associated dental plaque. *Infect. Immun.* 17: 43-54, 1977.
- 21) Takahashi, N., Iwami, Y. and Yamada, T.: Metabolism of intracellular polysaccharide in the cells of *Streptococcus mutans* under strictly anaerobic conditions. *Oral Microbiol. Immunol.* 6: 299-304, 1991.
- 22) Hoshino, H., Sato, M., Sasano, T. and Kota, K.: Plaque pH recovery by mouth-rinses with water. *J. Oral Biol.* 31: 218-223, 1989.
- 23) Dawes, C. and Dibdin, G. H.: A theoretical analysis of the effects of plaque thickness



and initial salivary sucrose concentration on diffusion of sucrose into dental plaque and its conversion to acid during salivary clearance. J. Dent. Res. 65: 89-94, 1986.

- 24 ) Brandon, M. and Sadler, E. B.: Sugar-free medicines. Pharm. J. 234: 824, 1985.
- 25 ) Johnson, D. I.: Sugar-free medicines - are you using them? Arch. Dis. Child. 61: 216-217, 1986.
- 26 ) Sadler, E. B.: Sugar-free medicines. Manchester: North Western Regional Drug Information Unit. 1986.
- 27 ) Imfeld, T. N.: Identification of low caries risk dietary components. Karger Press, Basel , 1983, pp. 117-141.

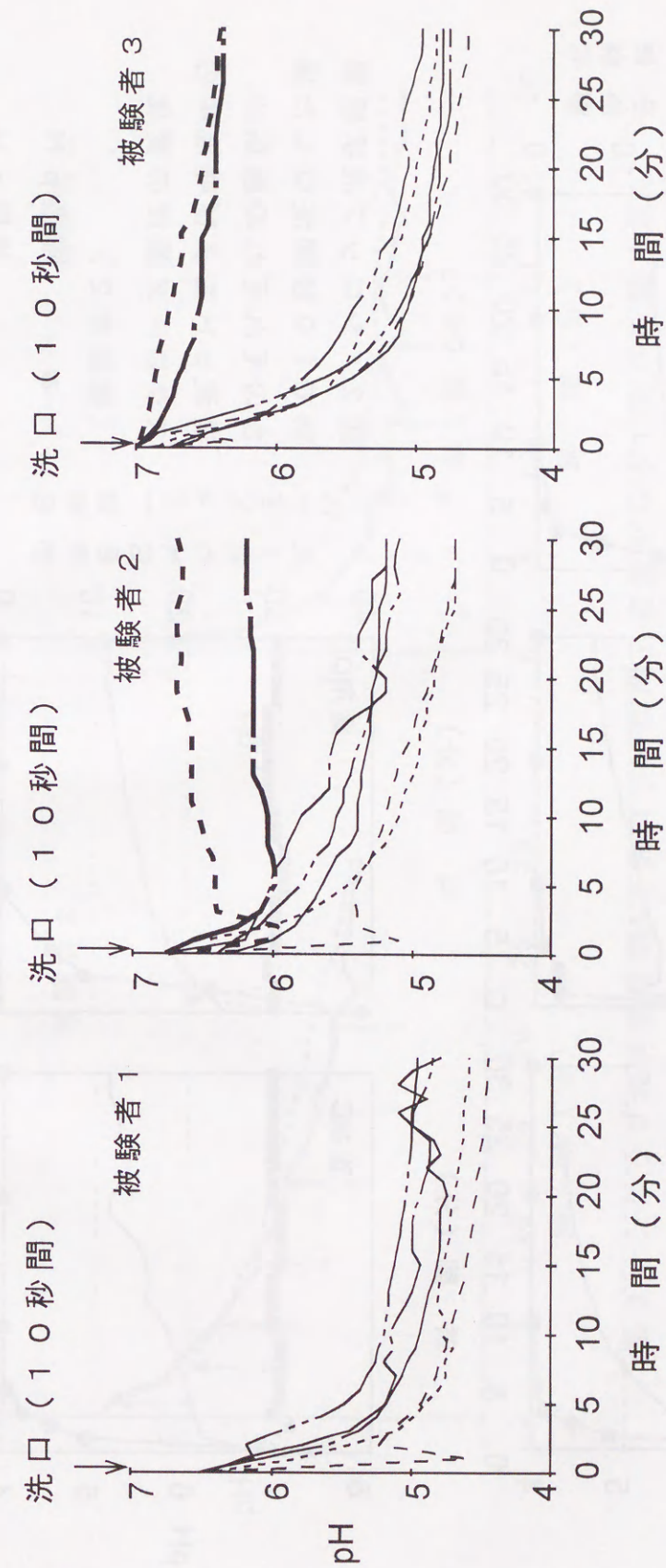


図1 シロップ液状総合感冒剤による歯垢pHの変化



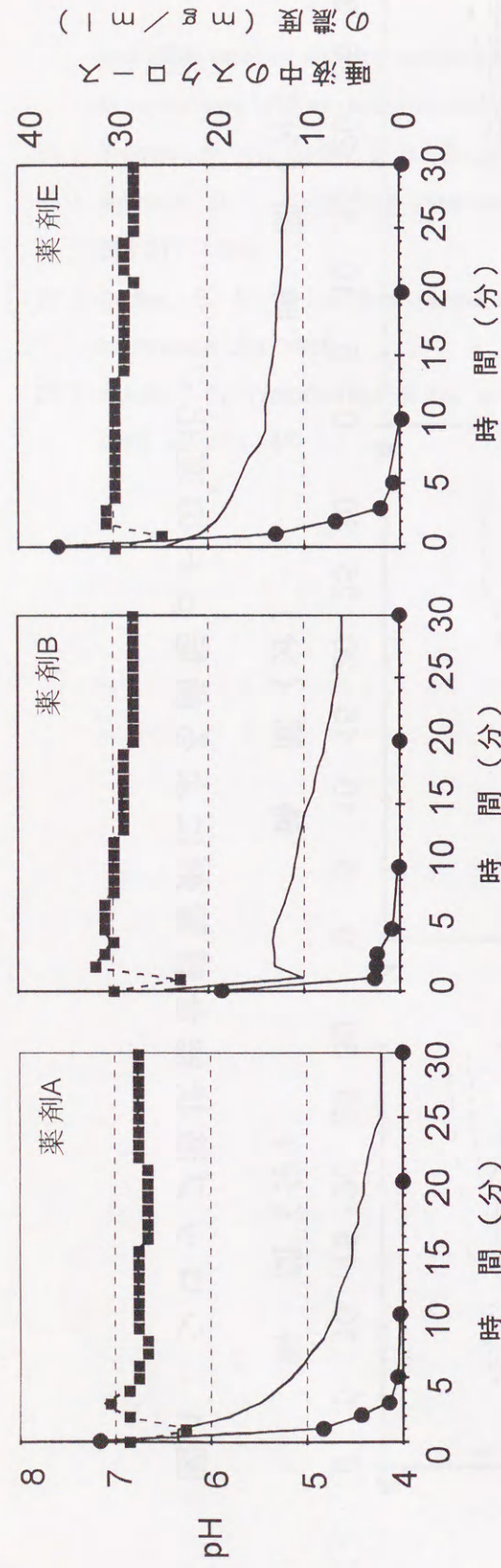


図2 シロップ液状感冒剤で10秒間洗口した場合のそれぞれの歯垢pH, 唾液pHおよび唾液中のスクロース濃度の変化 (被験者2)

● 唾液 pH  
— 歯垢 pH  
● スクロース濃度

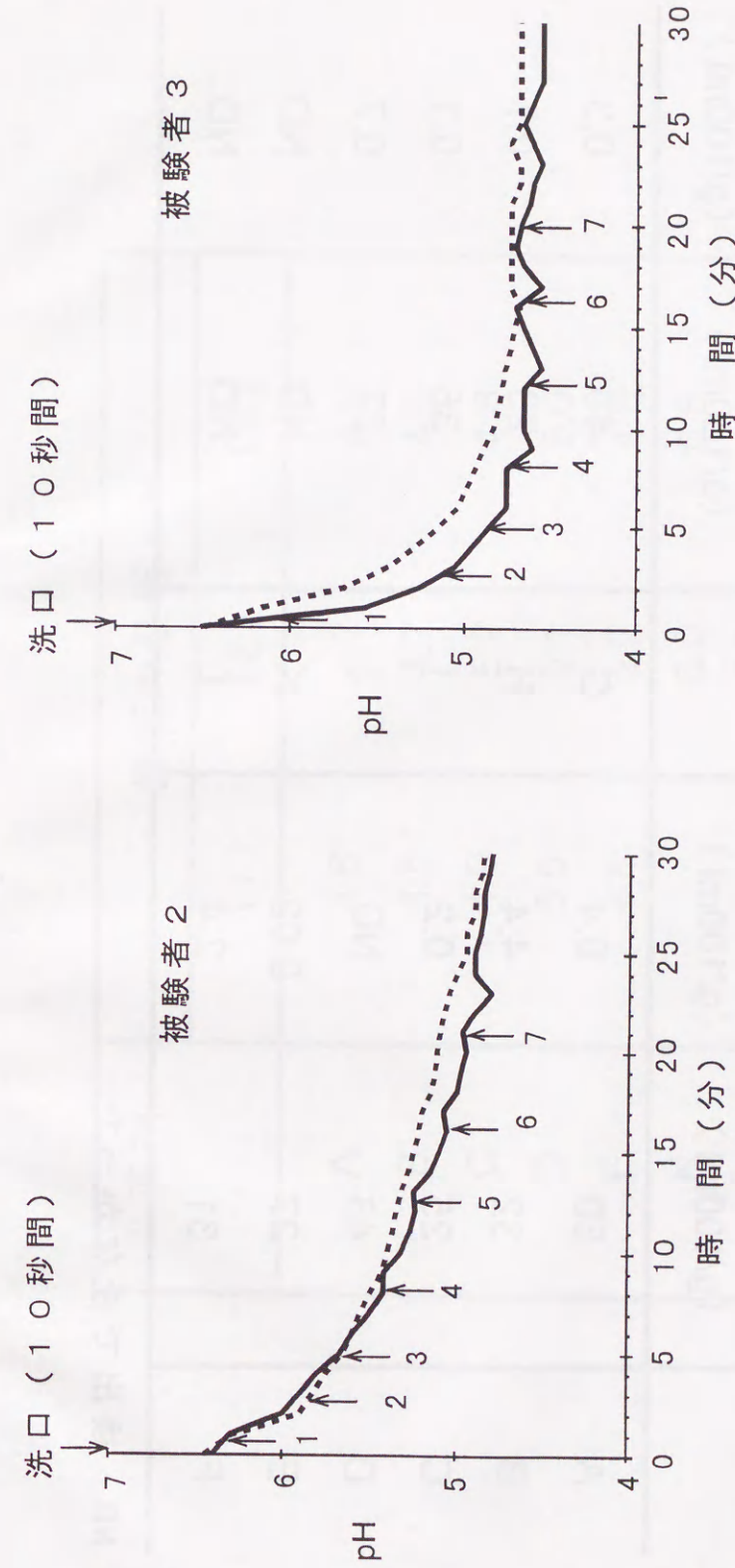
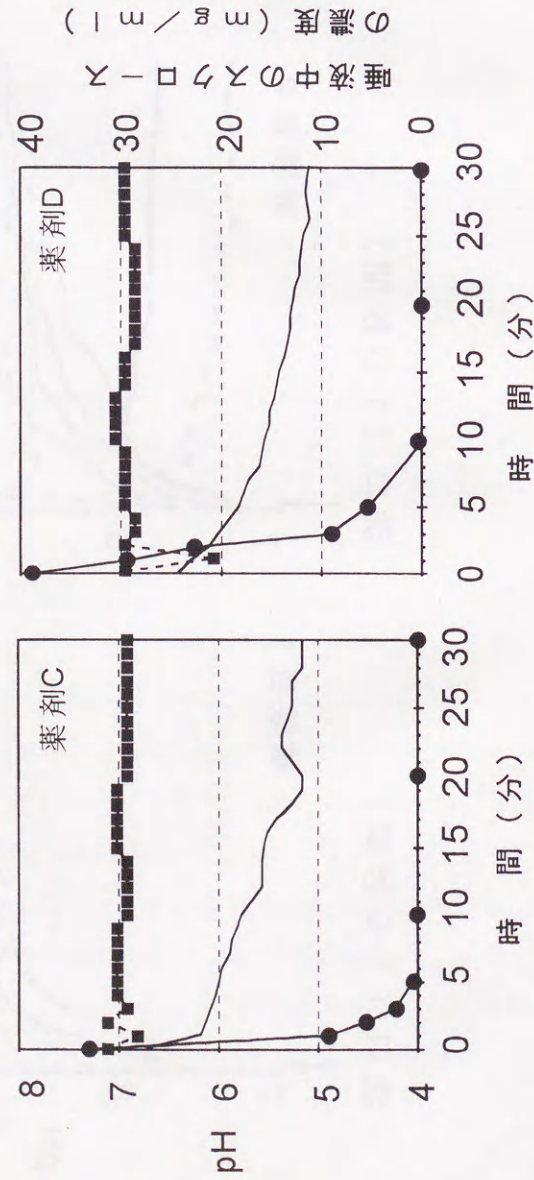


図3 シロップ液状感冒剤Aで洗口 (10秒間) 直後から水で洗口を繰り返した場合の歯垢 pH の変化

— 水で洗口した場合  
..... 水で洗口しなかった場合

↓ : 薬剤A 10ml で10秒間洗口  
↑ : 水で20ml で20秒間7回洗口



表 1 シロップ液状総合感冒剤中のスクロースおよびグルコースの含有量

| 薬剤 | スクロース<br>(g/100ml) | グルコース<br>(g/100ml) | 薬剤 | スクロース<br>(g/100ml) | グルコース<br>(g/100ml) |
|----|--------------------|--------------------|----|--------------------|--------------------|
| A  | 30                 | 0.4                | G  | 40                 | 0.3                |
| B  | 32                 | 4.4                | H  | 23                 | 0.7                |
| C  | 25                 | 0.2                | I  | 36                 | 0.1                |
| D  | 48                 | ND                 | J  | 37                 | 0.7                |
| E  | 27                 | 0.02               | K  | ND                 | ND                 |
| F  | 31                 | 2.4                | L  | ND                 | ND                 |

ND : 検出できなかった

| 薬剤 | 菌垢の最低 pH |     |     |
|----|----------|-----|-----|
|    | (1)      | (2) | (3) |
| A  | 4.6      | 4.7 | 4.9 |
| B  | 4.5      | 4.7 | 4.6 |
| C  | 4.9      | 5.2 | 4.8 |
| D  | 5.0      | 5.1 | 5.0 |
| E  | 4.8      | 5.2 | 4.8 |
| K  |          | 6.0 | 6.5 |
| L  |          | 6.3 | 6.4 |

表 2 種々のシロップ液状総合感冒剤を摂取した場合の菌垢の最低 pH



## 第五章 総括

本論文では、少量のヒト歯垢を用いて、液体試料の酸産生性を簡単に測定できる *in vitro* 法の開発を試みた。また、同じ液状試料の酸産生性を *in vitro* と *in vivo* の二つの方法で比較検討した。さらに、日本で市販されているシロップ液状総合感冒剤の酸産生性について検討した。得られた知見は以下のようにまとめられる。

*in vitro* アガロース包埋歯垢法では、同一の歯垢を何度も繰り返し使用可能であり、糖代謝に対して阻害効果をもつと考えられる物質などについて、その効果に持続性があるかどうかを検討する場合には、優れた方法であると考えられた。

同一の液体被検試料を用いて、*in vitro* 歯垢懸濁液法と *in vivo* 電極内蔵法の二つの方法で検定を行い、比較検討した。その結果、食品の原料素材や甘味料素材では、二つの方法によって得られた歯垢の最低 pH の間には正の相関関係がみられた。このことから、多くの原料素材の酸産生性の検定を行う場合などには、簡便に検定することのできる *in vitro* 歯垢懸濁液法が大きな役割をはたすと考えられる。

ただし、懸濁状態の歯垢により産生された酸が一定の容器の中に長時間にわたって蓄積されていく歯垢懸濁液法では実際のヒト歯垢 *in situ* の状態を反映するものではない。すなわち、実際のヒト歯垢においては、塊状の歯垢層に糖や唾液が侵入し、また歯垢において（特に歯垢深部で）産生された酸が、分泌された唾液の緩衝作用により中和されるなど、唾液の分泌が歯垢 pH の変動に大きく影響を与える。

しかし、そのような条件を十分に考慮し、かつ被検試料に緩衝能がないと判断される場合には、*in vitro* 歯垢懸濁液法は重要な情報を与えるものと考えられる。ただし、緩衝能のない試料を被検試料として *in vitro* 歯垢懸濁液法により得られた結果は *in vivo* 電極内蔵法で得られた最低 pH よりも低い傾向がみられた。

今回の検討によって、あらためて唾液のもつ緩衝作用や洗浄作用の歯垢 pH の変動に与える影響が見直された。その点に関しては大きな意義のある検討であったと思われる。ただし、被験者を確保して、それぞれの被験

者にあった歯垢 pH 測定装置を作成し、かつ長時間にわたって被験者を拘束して検討を行わなければならない *in vivo* 電極内蔵法に置きかわるべき *in vitro* の実験系を確立するにはいたらなかった。かえって *in vivo* 電極内蔵法の重要性を再認識させる結果になった。しかし、多大の負担を被験者に与え、煩雑な操作の要求される *in vivo* 電極内蔵法に置きかわるべき *in vitro* の実験系の確立を模索する努力は今後ともなされるべきであり、そのためには味覚や咀嚼により刺激されて分泌される唾液のはたらきに大きな考慮を払わなければならないと考えられる。液状試料の検討を行った場合にも種々の考慮すべき要件があらためて明確にされたが、今後は、実際の食品などの酸産生性を検討することのできる *in vitro* の実験システムについても開発の努力が必要とされることが考えられた。

また、今回は、現在日本で市販されている小児用シロップ液状総合感冒剤について、*in vivo* 電極内蔵法で検討を行い、ほとんどのシロップ液状総合感冒剤を服用した場合に歯垢の pH が臨界 pH とされている 5.5 よりも低下することがわかった。ただし、1 社によってシュガーレスと表示され販売されているシロップ液状総合感冒剤では服用後も酸産生性がほとんど認められなかった。そこで、う蝕発生の危険性を未然に防ぐためには含有されているスクロースを非酸産生の適切な代用甘味料に置き換える必要があることが強く示唆された。

ところで、シロップ液状総合感冒剤の酸産生性を *in vivo* 電極内蔵法で検討している過程において、それらの薬剤摂取後に唾液中のスクロースがほとんど消失してもさらに歯垢 pH は低下し続けること、そして、水道水で洗口しても歯垢 pH の低下を防ぐことのできないことが明らかになった。おそらく歯垢中の細菌が短時間の内にシロップ液状総合感冒剤中に含まれているスクロースを菌体内に取り込んで、菌体内グリコーゲンなどとして蓄積し、これらを利用して酸を産生し続けていることが推察されたが、実験により確かめることはできなかった。

このように、今回の一連の検討では初期の目的にはなかった、口腔内の複雑な要因があらためて明確にされた。今後はこのような要因を十分に考慮して、歯垢 pH の変動について検討を行うべきと考えられる。



## 謝 辞

本研究に多大な御指導と御教示を賜り、さらに、恵まれた機会を与えて頂きました指導教官 東北大学歯学部口腔生化学講座 山田 正 教授に心より感謝申し上げます。本研究の進行あるいは日々の研究生活において、常に御教示いただいた東北大学歯学部口腔生化学講座 阿部 一彦先生、岩見 憲道先生、高橋 信博先生、阿部 昌子先生に心より深く感謝致します。また、たいへんお世話になった水戸 幸子先生、岡田 直人先生に感謝致します。そして、宮城県桃生郡鳴瀬町歯科診療所 五十嵐公英博士、研究室の先輩、後輩の方々に御協力を頂き、厚くお礼を申し上げます。

最後に、著者は日本の国費留学生として、日本文部省の5年間にわたる援助に謝意を表します。



